

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表平6-506973

第3部門第3区分

(43) 公表日 平成6年(1994)8月4日

(51) Int.Cl. ⁸	識別記号	庁内整理番号	F I
C 0 8 B 37/10		7433-4C	
A 6 1 K 31/725	A D S	8314-4C	
C 0 7 H 11/00		7822-4C	

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 20 頁)

(21) 出願番号	特願平4-510890
(86) (22) 出願日	平成4年(1992)4月15日
(85) 翻訳文提出日	平成5年(1993)10月18日
(86) 国際出願番号	P C T / U S 9 2 / 0 3 0 9 2
(87) 国際公開番号	W O 9 2 / 1 8 5 4 6
(87) 国際公開日	平成4年(1992)10月29日
(31) 優先権主張番号	6 8 6 , 5 4 0
(32) 優先日	1991年4月17日
(33) 優先権主張国	米国 (U S)
(81) 指定国	EP (A T , B E , C H , D E , D K , E S , F R , G B , G R , I T , L U , M C , N L , S E) , A U , C A , J P , N O , U S

(71) 出願人	グライコメッド インコーポレイテッド アメリカ合衆国 カリフォルニア 94501 アラミーダ, アトランティック アベニ ュー 860
(72) 発明者	コンラッド, エイチ. エドワード アメリカ合衆国 カリフォルニア 94501 アラミーダ, ウォータービュー アイル 621
(72) 発明者	フュージェディ, ピーター アメリカ合衆国 カリフォルニア 94501 アラミーダ, ナンバーシー-214, ウェス トライン ドライブ 344
(74) 代理人	弁理士 山本 秀策

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 平滑筋細胞増殖のインヒビターとしての硫酸化多糖類

(57) 【要約】

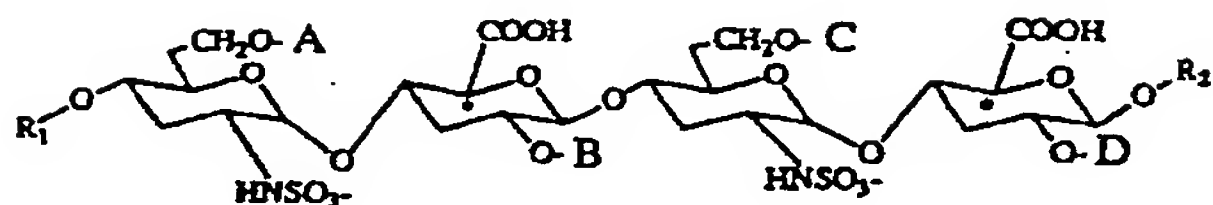
六糖類および八糖類化合物の形態の高度に硫酸化されたオリゴ糖は、平滑筋細胞に関して抗増殖活性を有し、喘息、うっ血性心不全および高血圧のような外傷あるいは病気状態の結果として起こるような望ましくない平滑筋細胞の増殖を特徴とする状態の治療に有用である。オリゴ糖は、市販のヘパリンおよび/あるいはヘパリンの非分断片と比べて、平滑筋細胞増殖の阻害能を増大させ、抗凝固剤としての作用能を減少させた。

請求の範囲

式 I(a)

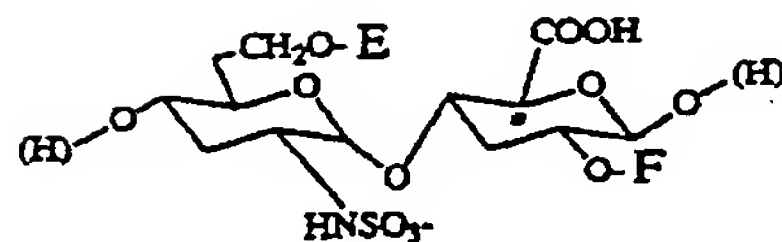
1. 平滑筋細胞の増殖を阻害し得る化合物であって、該化合物は、次の構造式を有する:

式 I



ここで、A、B、CおよびDの各々は、独立してHあるいはSO₃Rであり、そして各Rは独立してHあるいは陽イオンである、ただしA、B、CあるいはDの少なくとも2つは-SO₃Rである; ここで、糖のヒドロキシル基は、式IおよびI(a)において、より明瞭にするために省略されており、COOHで置換された炭素付近の *印は、IあるいはI(a)のいずれかにおいて任意の可能な立体化学を示し; R₁およびR₂は、各々独立して、水素あるいは、次の構造式を有する1つ以上の繰り返し単位である:

(以下余白)



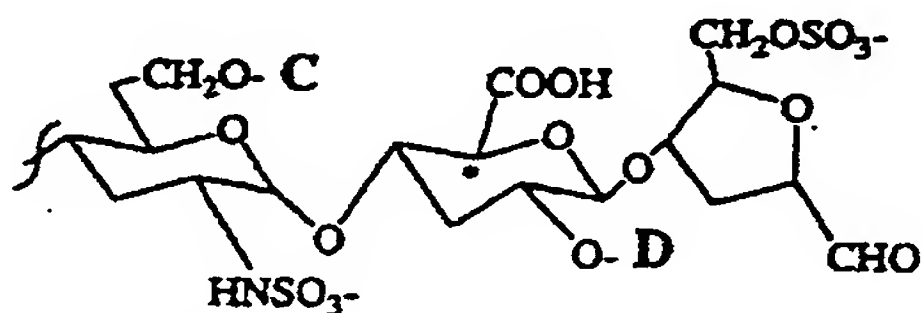
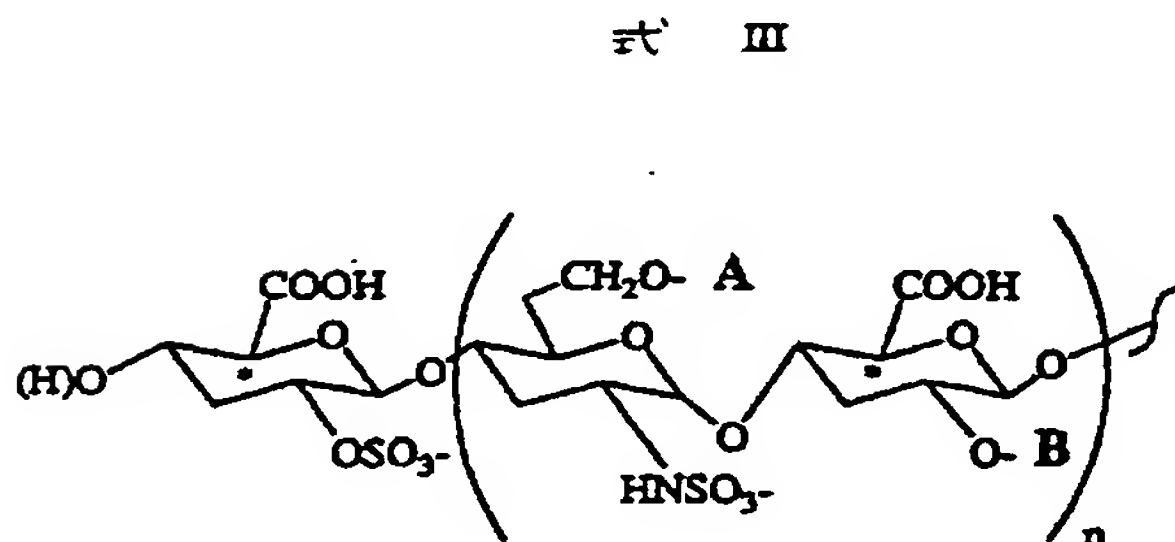
ここで、式I(a)の単位が1つの末端で連結されるとき、該末端で水素が存在せず; そしてEおよびFの各々は独立して水素あるいはSO₃Rである、ここで、各糖の3位にヒドロキシル基が存在するが、より明瞭にするために省略されている。

2. A、B、CあるいはDの少なくとも3つが-SO₃Rである、請求項1に記載の化合物。

3. A、B、CおよびDのすべてが-SO₃Rである、請求項2に記載の化合物。

4. R₁およびR₂が水素であり、各RがH、Na、K、CaあるいはNH₄である、請求項1に記載の化合物。

5. 平滑筋細胞の増殖を阻害し得る六糖類および八糖類化合物の混合物であって、該混合物中の化合物は、次の構造式を有する:



ここで、nは1あるいは2であり、そしてA、B、CおよびDの各々が、独立してHあるいはSO₃Rであり、ここで、各Rは独立してHあるいは陽イオンである、ただし、該A、B、CおよびDの少なくとも2つはSO₃Rである; そして、ここで、各糖の3位にヒドロキシル基が存在するが、図式からは省略されている; そして、ここで、カルボキシル基で置換された炭素上の *印は、立体化学が決っていないことを示す。

6. A、B、CあるいはDの少なくとも3つが-SO₃Rである、請求項5に記載の混合物。

7. A、B、CあるいはDの少なくとも4つが-SO₃Rである、請求項5に記載の混合物。

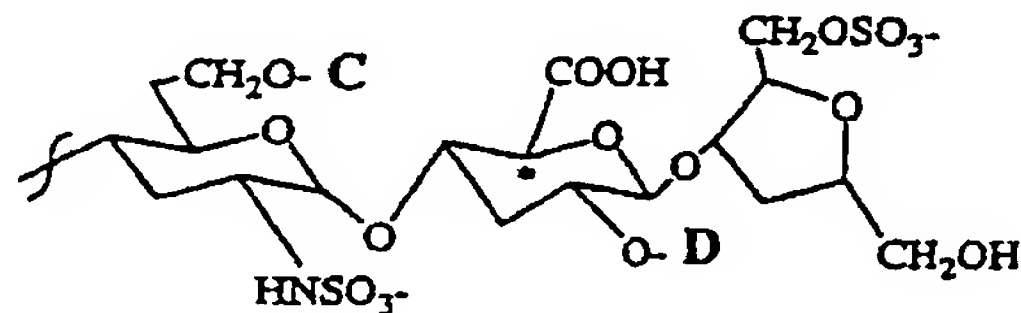
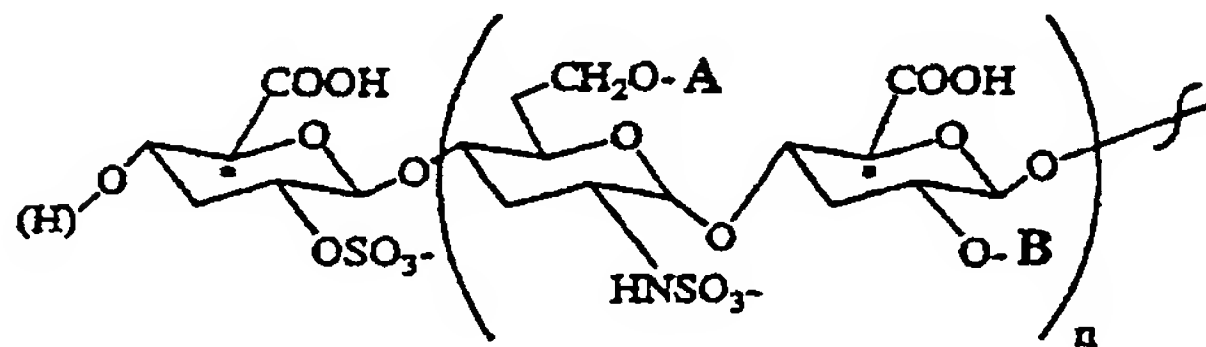
8. A、B、CあるいはDの少なくとも5つが-SO₃Rである、請求項5に記載の混合物。

9. A、B、CおよびDのすべてが-SO₃Rである、請求項5に記載の混合物。

10. 各RがH、Na、K、CaあるいはNH₄である、請求項5に記載の化合物。

11. 平滑筋細胞の増殖を阻害し得る六糖類および八糖類化合物の混合物であって、該混合物中の化合物は、次の構造式を有する:

式 III(a)



ここで、 n は1あるいは2であり、そしてA、B、CおよびDの各々は、独立してHあるいは SO_3R であり、ここで、各Rは独立してHあるいは陽イオンである、ただし、該A、B、CおよびDの少なくとも2つは SO_3R である；そして、ここで、各糖の3位にヒドロキシル基が存在するが、図式からは省略されている；そして、ここで、カルボキシル基で置換された炭素上の*印は、立体化学が決っていないことを示す。

12. A、B、CあるいはDの少なくとも3つが SO_3R である、請求項11に記載の混合物。

13. A、B、CあるいはDの少なくとも4つが SO_3R である、請求項11に記載の混合物。

14. A、B、CあるいはDの少なくとも5つが SO_3R である、請求項11に記載の混合物。

15. A、B、CおよびDのすべてが SO_3R である、請求項11に記載の混合物。

16. 各RがH、Na、K、Caあるいは R_4N^+ である、請求項11に記載の化合物。

17. 望ましくない平滑筋細胞の増殖を特徴とする状態の治療に有用な薬学的組成物であって、

六糖類および八糖類あるいは薬学的に受容可能なそれらの塩から成る群から選択されるオリゴ糖断片の形態の薬学的に有効な量のヘパリン消化物誘導体であって、該断片が、市販のヘパリンに比べて、平滑筋細胞の増殖を阻害する増大した活性、および抗凝固剤として作用する減少した活性を有する

明細書

平滑筋細胞増殖のインヒビターとしての硫酸化多糖類

技術分野

本発明は、治療および診断組成物としての炭水化物調製物の使用に関する。特に、本発明は、6個以上の糖単位を有する多糖類、そして過度の平滑筋細胞増殖を特徴とする疾患および状態を治療するのに有用であるそのような多糖類を含有する組成物に関する。

既 知

合成的に生成されたオリゴマーおよびヘパリンから誘導されたオリゴマーの表記において、次の略語が使用される： D-グルクロン酸 = GlcA；L-イズロン酸 = IdoA；D-グルコサミン = GlcNH₂；N-アセチル-D-グルコサミン = GlcNAc；D-グルコサミン N-硫酸 = GlcNS；2,5-アンヒドロマンノース = Man(2,5)；2,5-アンヒドロマンニトール = ManB(2,5)；D-キシロース = Xyl；グリコサミノグリカン = GAG。

O-連結された硫酸残基の位置は、「S」および硫酸残基が糖残基上の炭素に連結される硫酸化の位置の番号によって示される。これらの命名においてはまた、 α および β のアノマー連結は、ヘパリンに通常見い出される連結であり、表示されたDまたはLの配置が通常見られ関係する。硫酸基の位置

；および

薬学的に受容可能な担体、
を含有する薬学的組成物。

は、略語が適用される糖の略語の下に示され、それゆえ、例えば、

IdoA-GlcNS

2S 6S

は、糖残基の2位および6位でそれぞれ結合した硫酸基を有するL-イズロン酸およびD-グルコサミンN-硫酸を示す。

背景技術

血管壁における平滑筋細胞増殖は、血管の損傷に反応して起こり、そして特定の病気状態に関連して起こる(Austin, G. E.ら、*J. Am. Coll. Cardiol.* (1985) 5:369-373)。これらの細胞増殖は、過剰なタンパク質または他のマトリックス分子の生成による負の効果を有し得る。その過剰なタンパク質または他のマトリックス分子は、それら細胞自身と共にあり、例えば、アテローム性硬化症、腎性高血圧症、肺高血圧症、脈管炎、および術後血管性網膜症のような病変を形成する。これらの結果は、血液凝固を特徴とする外傷に対する急性の応答と区別される。

グリコサミノグリカン(GAG)は、ヘキソサミン残基とアルドゥロン酸残基が交互に並ぶコポリマーであり、それらは硫酸化された形態で見い出され、プロテオグリカンとして合成される。それらは、総称してムコ多糖と呼ばれ、ヘパリン中のムコ多糖は、さらに正確には、グリコサミノグリクロナンと呼ばれる。

下記で議論される組成物を説明するために、ヘパリンおよびヘパラン硫酸が、ヘキソサミン/アルドクロン酸の繰り返し単位の性質によって分類されるGAGファミリーのメンバーであることが注目され得る。例えば、コンドロイチン硫酸において、アルドクロン酸は主としてD-グルクロン酸であり、そしてヘキソサミンは、より一般的にはN-アセチルガラクトサミンとして知られGalNAcと略称されるN-アセチル化2-アミノ-2-デオキシ-D-ガラクトースである。

デルマトン硫酸(コンドロイチン硫酸B)において、アルドクロン酸は、大抵はL-イズロン酸であり、ヘキソサミンはGalNAcである。ケラタン硫酸において、アルドクロン酸はD-ガラクトースで置き換えられ、そしてヘキソサミンは、大抵は、より一般的にはN-アセチルグルコサミンとして知られGlcNAcと略称されるN-アセチル化2-アミノ-2-デオキシ-D-グルコースである。

本明細書中で関係ある組成物、ヘパラン硫酸およびヘパリンにおいて、ヘキソサミンは、大抵はN-アセチル化またはN-硫酸化グルコサミン(GlcN)であり、そしてアルドクロン酸は、ヘパリンでは大抵L-イズロン酸であり、ヘパラン硫酸では大抵D-グルクロン酸である。ヘパラン硫酸は、一般に、ヘパリンより高い比率でグルクロン酸を含有すると考えられている。

組織から単離されたヘパラン硫酸またはヘパリンの調製物における不均質性の問題は、明確な区別を困難にする。その理由は、これらのオリゴ糖が下記に説明するように生合成経

路に関連しているからである。通常のヘパリン(抗凝固剤として使用される)は、5-25 kDaの分子量を有し、通常の手法によって種々の鎖の長さの混合物として抽出される。これらの手法は、自己融解、およびウシ、またはブタの肺、腸または肝臓のような適切な組織の抽出、ならびに他のGAGおよび非多糖類成分の除去を包含する。

抽出物中の鎖の分子量は、組織で合成されるヘパリンプロテオグリカンの多量種中にあることが知られている50-100 kDの鎖よりかなり低い。GAG部分は、配列 D-GlcA-D-Gal-D-Gal-D-Xyl-タンパク質の四糖類連結領域を介して、セリン残基でペプチドマトリックスに結合して合成され、そしてその四糖類連結領域は、次いで、GlcNAcおよびGlcAを交互に付加してD-GlcA残基で延長される。

多糖類の側鎖は一連の酵素群で修飾され、それらの酵素は、連続的に、N-アセチルグルコサミンを脱アセチル化し、アセチル基を硫酸基で置き換え、D-グルクロン酸残基のC5位でヒドロキシル基をエピマー化し(L-イズロン酸に変換する)、その結果生じたL-イズロン酸のO-2位およびグルコサミン残基のO-6位を硫酸化する。鎖のいくつかは、ヘパランまたはヘパリンの位置のいずれかにおいて、グルコサミン残基のO-3位でさらに硫酸化される。この後者の硫酸化は、抗トロンビンIII結合およびそれによる抗凝固活性に必要な活性配列を生じる。他の化学的に可能な硫酸化部位は、D-グルクロン酸のO-2位にある。

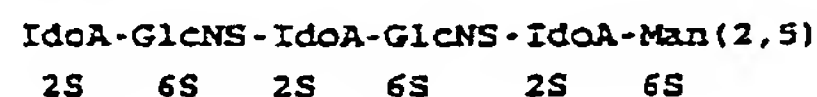
それらの明らかな化学的類似性により、単離された「ヘパリン」は、別に、ヘパラン硫酸として分類され得る相当量を含有し得る。

ヘパリン/ヘパラン硫酸鎖の脱ポリマー化およびサイズによる生成物の分離に関する広範な技術群がある。Guo, Y.ら, *Anal Biochem* (1988) 168:54-62の報告が特に関係しており、還元末端部の2,5-アンヒドロマンノースが還元されて対応する2,5-アンヒドロマンニトールになった後の構造決定の結果を開示している。

ヘパリンまたはヘパラン硫酸またはその分解生成物が平滑筋の増殖に関与することが、ある期間認められる。ヘパリンおよびヘパラン硫酸は、本明細書中の上記の機構に関連した血管性平滑筋細胞増殖を遅くし得るか、または阻止し得る(Claves, A.F.ら, *Nature* (1977) 265:625-626)。平滑筋細胞増殖に対するヘパラン硫酸およびヘパリンの効果はまた、*Biology of Proteoglycan*, Academic Press (1987) pp. 301-343中にMarcus, J.A.らによって記載されている。ヘパリンによる血管性平滑筋細胞の成長阻害は、さらにCastellot, J.J., Jr.ら, *J Biol Chem* (1982) 257:11258-11260に記載され、そして胎児組織の血管性平滑筋細胞の成長に対するヘパリンの効果は、Benitz, V.E.ら, *J Cell Physiol* (1985) 127:1-7に記載されている。血管周囲細胞および平滑筋細胞増殖の両方のインヒビターとしてのヘパリンの効果は、Orlidge, A.ら, *Microvascular Research* (1986) 31:41-53に示され、そしてこ

れらの著者はさらに、コンドロイチン硫酸およびデルマトン硫酸がこの効果を有しないことを示した。平滑筋細胞増殖に対するヘパリンおよびヘパラン硫酸の効果に関する総説は、Benitz, V.E.による、「誘導型：正常と異常」Pishean, A.P.編、ペンシルバニア大学プレス(1988)中にある。

どんなメカニズムでこれらのグリコサミノグリカンが作用するのか、またはどの程度それらが上皮細胞成長因子および線維芽細胞成長因子のような他の成長因子と相互作用するのか明らかではない。少なくとも5個の鎖のオリゴ糖中のグルコサミン上の3-O位の硫酸基が、このプロセスで重要であるということが提案されている(Castellot, J.J.ら, *J Cell Physiol* (1984) 120:315-320; Castellot, J.J.ら, *J Cell Biol* (1986) 101:1979-1984)。ヘパリンの部分的亜硫酸消化から得られた六糖類-十糖類は、酸性線維芽細胞成長因子に結合し、線維芽細胞中でそのマイトジェン活性を促進するが、いくつかの条件下では上皮細胞の増殖を阻害する(Barzu, T.ら, *J Cell Physiol* (1989) 140:538-548)。有効な六糖類が陳述され、下記の構造:



を有した。

2-O-硫酸化グルクロン酸の存在が抗増殖活性には必要ではないことを示した報告がある(Wright, Jr., T.C.ら, *J Biol*

Chen (1989) 254:1534-1542)。この論文で、亜硝酸開裂およびゲル透過により調製された、限定された長さの、サイズ分離された断片が、いくつかのアッセイで電荷に従ってさらに分離された。サイズに従ってのみ分離された部分消化されたヘパリンが、平滑筋細胞および上皮細胞の成長の刺激に関して試験された。その結果は同一ではなかったが、類似の結果が両方の場合に見い出された。試験されたタイプの四糖類は、非常に低い抗増殖活性を有することが示された：六糖類、八糖類、および十糖類は、重量/容量の濃度基準でほぼ同じレベルで活性であることが示された。ヘパリンの抗トロンビンIIIへの結合に必要なヘパリンの特有配列を示す合成ペンタペプチドもまた試験された：このペンタペプチドは平滑筋に対する増殖阻害には活性であったが、上皮細胞の増殖阻害には活性でなかった。次に、サイズ分離された断片を化学的に処理し、「O-過硫酸化」を行った。そしてこの処理は阻害活性を増大させた；実際、四糖類断片調製物の過硫酸化は、増殖阻害で活性な四糖類断片を生じた。グルコサミンのアミノ基の脱硫酸化および再アセチル化を包含する逆プロセスは、抗増殖活性の減少を生じる。しかし、これらの断片は、次の過硫酸化によって、より活性にされ得た。

総負電荷を減少させるためのカルボキシル基の還元はまた、ヘパリン断片の活性を減少させ得た。O-過硫酸化は、部分的にこの活性を回復する。抗増殖活性を欠いているN-脱硫酸化、N-アセチル化断片を用いたこれらの結果は、同様に処理され

たヘパリンが、細胞分裂を妨げる能力を保持しているという以前の結果とは区別される。なぜなら、抗増殖活性のサイズ依存性 -- より大きい断片がより小さい断片より一般に強力であるであるという理由からである。

サイズ分離された断片がさらに、電荷に従って分離されたとき、最も高く荷電された画分が最も強い活性を示すことが見い出された。さらに、抗トロンビンIII結合部位として同定された合成五糖類は、平滑筋細胞で増殖を阻害し得るが、このペンタペプチドに相当する配列を壊すであろう、ヘパリンの任意の処理(例えば、過ヨウ素酸塩処理)は、抗増殖活性を壊さない、ということが示された。

オリゴ糖を合成する方法は、1990年7月14日に発行された米国特許第4,943,830号に開示されており、それはそのような方法を開示するために参考のために本明細書に援用される。

本発明者らは今回、平滑筋細胞に関して増大した抗増殖活性が、高度に硫酸化され、そして6または8個の糖単位を含有するヘパリンまたはヘパリン硫酸GAGのオリゴ糖部分に関連していることを見出し、そのオリゴ糖が平滑筋細胞に関して増大した抗増殖活性を有する、6またはそれ以上の糖残基を含有する多糖類を作る合成メカニズムを提供した。

発明の開示

本発明は、平滑筋細胞に関して優れた特異的な抗増殖活性を有する低分子量のグリコサミノグリカン(GAG)組成物を提供

する。低分子量GAGにおけるこの活性の存在は、合成によって、または天然の原料からの組成物の単離によって調製され得る有効な薬学的組成物に対する機会を提供する。

従って、1つの面では、本発明は、抗増殖活性を有する硫酸化多糖類を調製するプロセスに関する。本発明の多糖類は、本明細書中に開示されるような一連の化学反応を用いて合成的に生成され得るか、またはヘパリンを消化し、本明細書中に開示されるようなサイズおよび電荷に基づく分離手法を行うことにより生成し得る。

本発明の多糖類化合物を合成的に生成するために、イズロン酸シントンを合成することがまず必要である。次に、グルコサミンシントンが生成される。イズロン酸シントンおよびグルコサミンシントンは、二糖類シントンを生成するために反応する。二糖類単位は、4個、6個、8個またはそれらの任意の倍数の単糖類単位を含有するオリゴ糖を形成するために反応し得、および/または任意の奇数個の糖単位を含有するオリゴ糖を提供するためにイズロン酸またはグルコサミンの反応シントンのいずれかと反応し得る。

消化によってオリゴ糖化合物を得るために、ヘパリンが天然原料から得られ、そして多量の六糖類および八糖類を含有するオリゴ糖混合物の形成を有利にする条件下で亜硝酸による消化を受ける。消化に続いて、混合物はサイズに従って分離され、そして六糖類および八糖類に対応するそれらの画分は一緒にされ、回収される。次に、回収された部分は、より

高度に荷電された画分を得るために、電荷に従って分離される。これらの画分は、高度に硫酸化されているオリゴ糖を含有し得る。Glc8のO-3位(抗凝固活性に関連している)で硫酸化された多糖類は、本発明には包含されない。

本発明はまた、本発明のオリゴ糖単独、または賦形剤、例えば、薬効のない薬学的に受容可能な物質との組合せ、のいずれかを包含する薬学的組成物に関する。そのような組成物は、平滑筋細胞増殖を調節するために患者に投与され得る。

本発明の第一の目的は、6個以上の単糖類単位を含有する合成的に生成されたオリゴ糖を提供することであり、そのオリゴ糖は、Glc8のO-3位以外の特定の位置で高度に硫酸化され、そして平滑筋細胞増殖に影響する。

本発明の別の重要な目的は、天然のヘパリンまたはヘパリン硫酸から六糖類および八糖類単位を得る方法を提供することであり、その六糖類および八糖類単位は平滑筋細胞増殖の調節に有効であり、そしてその方法は抗凝固活性度をあまり加工しない。

本発明の有利点は、オリゴ糖単位が、平滑筋細胞増殖の調節を補助するために投与され得る薬学的組成物中に製剤化され得ることである。

本発明の特徴は、オリゴ糖単位が、(O-3位以外の)特定の位置で硫酸化される単糖類残基を含有し、その特定の位置がオリゴ糖の平滑筋細胞増殖を調節する能力に影響することである。

本発明の、これらおよび他の目的、有利点および特徴は、下記に、より十分に記載される構造、合成および使用法の詳細を読み、本明細書で同じ記号が、すべて同じ分子部分を言及する、を本明細書の一部を形成する付随の図および一般構造式を参照すれば、当業者には明らかになり得る。

図面の簡単な説明

図1 Aおよび1 Bは、亜硝酸の量を変化させることを用いて生成された反応混合物のゲル濾過クロマトグラフィーからの溶出プロファイルを示す。

図2は、種々のサイズの園分の成長阻害活性を示す。

図3 Aおよび3 Bはそれぞれの、DEAE-トヨパールクロマトグラフィーからの六糖類および八糖類サブユニットの溶出プロファイルを示す。

図4 Aおよび4 Bは、図3 Aおよび3 Bの溶出プロファイルにおける、集められた種々の園分の成長阻害活性を示す。

図5 Aは、図3 Aに示されるS-6園分に対する逆相イオン対HPLCからの溶出プロファイルを示す。

図5 Bは、六糖類の総園分に匹敵するプロファイルを示す。

図6 A、6 Bおよび6 Cは、本発明の17個の八糖類に対する可能な硫酸化位置を示すチャートである。

好ましい実施態様の詳細な説明

本発明のオリゴ糖、および記載されるような製造および製

剤のプロセスの前に、本発明が記載される特定のオリゴ糖、製剤またはプロセスのような化合物、組成物および方法に限定されるものではなく、もちろん、多様であることが理解されるべきである。本明細書で使用される用語は、特定の実施態様のみを記載する目的のためにあり、そして限定されていることを意図しないということもまた理解されるべきである。なぜなら、本発明の範囲が添付の請求の範囲によってのみ限定され得るからである。

本明細書および添付の請求の範囲において使用されるように、単数形「a」、「an」および「the」は、内容が明瞭に別であることを指示しなければ、複数の指示語を包含することを注記する。それゆえ、例えば、「オリゴ糖」という言及はオリゴ糖の混合物を包含し、そして「八糖類」という言及は本明細書に記載されるタイプの八糖類の混合物を包含し、そして「プロセス工程」または「プロセス」への言及は本明細書に記載されるタイプの種々の工程およびプロセスへの言及を包含し、それらは当業者には公知であり、または当業者が本開示などを読めば明らかである。

定義

「ヘパリン/ヘパラン硫酸」または「ヘパリン」は、抗凝固剤としてヘパリンの調製に一般に行われている方法で組織から得られた調製物を意味するか、さもなければ合成され、そして組織から得られた調製物に相当するものを意味する。

本明細書に参考のために援用される、1989年7月7日発行のConrad, H. E., Heparin and Related Polysaccharides, Vol. 56, p. 18, Annals of N.Y. Academy of Sc.を参照のこと。この調製物は、ヘパラン硫酸の特徴としてのD-グルクロン酸(GlcA)残基およびヘパリンの特徴としてイズロン酸(IdoA)残基を含有し得る。しかし、GlcAおよびIdoAはともに両者において存在し、それらは異なった相対的値において存在する。ヘパラン硫酸としての(IdoA)/GlcA比の増加は、よりヘパリン様になる。上記の背景技術の節に記載したように、D-グルクロン酸のL-イズロン酸への変換は、ヘパラン型中間体におけるGlcA残基の5位の炭素でのエピマー化の結果である。そのようなエピマー化および変換に包含されるこの一連の工程は、当該技術において理解される。十分な変換が行われない程度まで、ヘパラン硫酸の特徴が調製物中で残存している。ヘパリン調製物中のポリマー鎖の正確な性質は一般に測定されておらず、そして調製物から調製物で変化するもので、用語「ヘパリン/ヘパラン硫酸」または「ヘパリン」は、適応される混合物の範囲をカバーすることを意図している。おそらく、ヘパラン硫酸をヘパリンと区別する主要な特徴は、後者が抗凝固活性を有することである。

「ヘパリン/ヘパラン硫酸」調製物は、所望であればヒトの組織を包含する種々のホ乳類組織から得られ得る。一般に、ブタまたはウシの原料が使用され、血管形成された組織が好ましい。ヘパリン/ヘパラン硫酸出発物質の好ましい原料は、

ブタの腸粘膜であり、この組織原料から調製された「ヘパリン」とラベルされた調製物が市販されている。一般に、ヘパリン/ヘパラン硫酸出発物質は、そして組織を自己融解させ、組織をアルカリで抽出し、続いてタンパク質を凝固させ、そして次に、酸性化により上清液からヘパリンタンパク質複合体を沈降させることにより、選択された組織原料から調製される。複合体は、エタノール、またはアセトン、またはそれらの混合液のような極性の非水溶媒で再沈殿させることによって回収され、そして脂肪は、エタノールのような有機溶媒を用いた抽出により、そしてタンパク質は、トリブシンのようなタンパク質分解酵素での処理により、除去される。ヘパリン出発物質の調製に適切な手法が、例えば、Charles, A. P. ら、Biochem J (1958) 50:1927-1933に見い出され、そしてこの基本的手法の改変法がまた、例えばCoyne, E. による、Chemistry and Biology of Heparin, Elsevier Publishers, North Holland, New York, Lunblad, R.L. ら編(1981)中に開示された手法などが公知である。

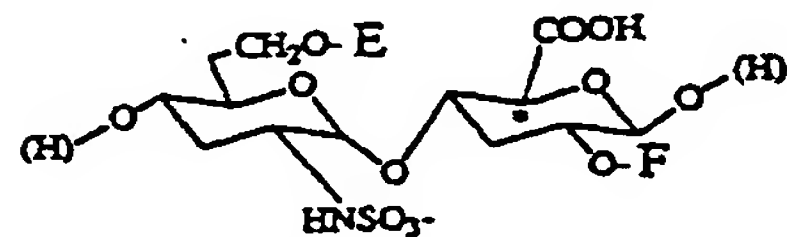
合成オリゴ糖

本発明の合成オリゴ糖は、少なくとも6個の糖残基単位を含有し、次の一般構造式を有する：

(以下余白)

(糖の3位のヒドロキシル基は、より明瞭にするために省略されている)、そしてCOOHで置換された炭素付近の・印は、分子に任意の可能な立体化学があり得るという立体化学が決っていないことを示す、;ここで、可変基のA、B、CおよびDの各々は、独立して水素またはSO₃Hである、ただし可変基の少なくとも2つはSO₃Hであり、そして各Rは独立してH⁺、H⁺、または他の適切な陽イオンである;そしてここで、R₁およびR₂は、各々独立して、水素または、次の構造を有する、1つ以上の繰り返し単位である:

式 I(a)



ここで、構造式 I (a) の単位が一端で連結されるとき水素が存在せず、そして連結されない末端の水素は存在し、さらにここで、可変基 E および F の各々は、独立して水素または SO₃H である。

本発明のいくつかの好ましい実施態様は、構造式 I の化合物を包含し、ここで A、B、C および D の各々は、-SO₃⁻ であり、そして R₁ または R₂ のいずれかは構造式 I (a) の単位であ

る。別の好ましい実施態様は、構造式 I の化合物を包含し、ここで A、B、C および D の各々は、-SO₃⁻ であり、そして R₁ および R₂ の両方が構造式 I (a) の単位であり、そしてここで、単位 I (a) の各 E および F は -SO₃⁻ である。

ヘパリンおよび／またはヘパラン硫酸から誘導される多糖類

好ましくは、出発物質として用いられるヘパリン／ヘパラン硫酸鹽製物は、最初に、エタノールまたはアセトンのようなヘパリンが溶解しない溶媒で抽出することにより精製される。次いで、精製された出発物質は脱ポリマー化される。

一般に、脱ポリマー化には、亜硝酸、ヘパリナーゼ、または過ヨウ素酸塩のような種々の試薬が用いられ得る。本発明の抗増殖性組成物は、六糖類および八糖類の断片の形成を最大にするような条件下で、亜硝酸による部分消化が行われる場合に得られ得る。

典型的な手法においては、亜硝酸は、50mM濃度の亜硝酸ナトリウム溶液を酸性化することによりその場で調製される。そしてその試薬は、ヘパリンを処理するために、pH約1.0〜約2.0、好ましくは約1.5で、60〜180mg/ml濃度で用いられる。この反応は、室温で行われ、そして消化の所望の段階で適切な試薬を添加することにより中和され得る。活性成分、すなわち、(1)主に六糖類および八糖類である成分;(2)著しく硫酸化されている成分;(3)平滑筋細胞に関して実質的な抗増殖活性を有する成分;および(4)わずかな抗凝固活性を有するか、

または抗凝固活性を有さない成分、を生成するならば、他の脱ポリマー化法も使用され得る。

次に、単離された断片は、平滑筋細胞の増殖を阻害する能力に対して試験され得る。(市販のヘパリンに対して、)平滑筋細胞の増殖を阻害することに関して高い活性を有する断片および血液凝固を阻害する能力に関して低い活性を有する断片が好ましい。

脱ポリマー化により断片の混合物が生じ、それは次いでサイズに基づいて分離される。ゲル浸透法、密度勾配遠心分離法を包含する種々のサイズによる分離技法が利用され得る;約100〜3500ダルトンの分画範囲を有するセファデックスゲル系またはポリアクリルアミドゲル系を用いたゲル浸透クロマトグラフィーが特に好ましい。特に好ましいゲル浸透樹脂はバイオゲル(Biogel) P10であり、そしてこの方法を用いた分離に基づいて、二糖類、四糖類、六糖類、八糖類および高分子量のオリゴ糖である断片が効果的に分離される。

主に六糖類および八糖類の単位を含有する画分は、平滑筋細胞の増殖を阻害することにおいて増大した活性を示す。この特性の証明は、標準的アッセイ、例えば、Castellot, J. J. Jr.ら, *J Cell Biol* (1986) 102:1979-1984に記載されているアッセイを用いて得られ得る。他のアッセイ法、例えば、Benitz, W. E.ら, *J Cell Physiol* (1986) 127:1-7の方法もまた用いられ得る。

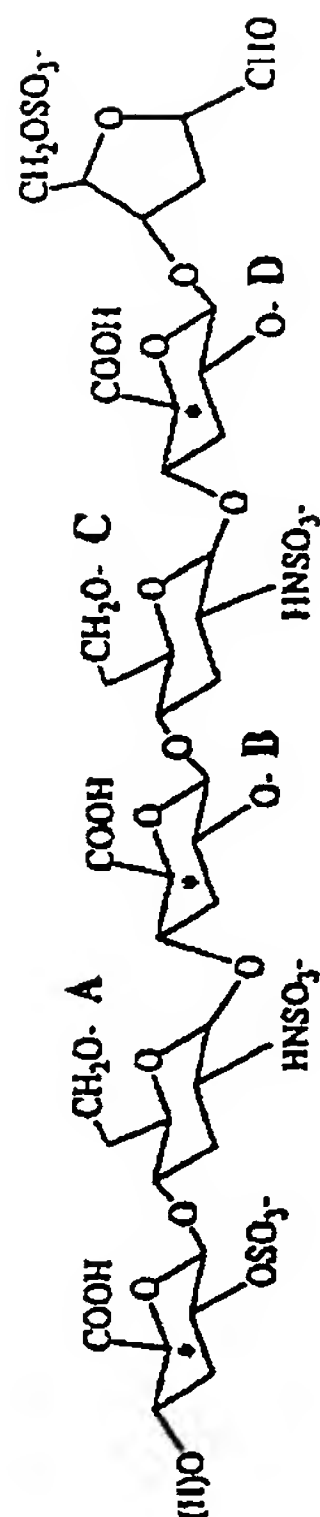
このようにして得られる六糖類断片は次式の通りであり:

ここで、可変基 A、B、C および D は、独立して H または SO_3R であり、そして各 R は、独立して H または陽イオンであり、ただし、可変基 A、B、C または D の少なくとも 2 つは $-\text{SO}_3\text{R}$ である。糖の 3 位のヒドロキシル基は、より明瞭にするため省略され、そして COOH の隣接の * 印は立体化学が決まっていないことを示すことが指摘される。

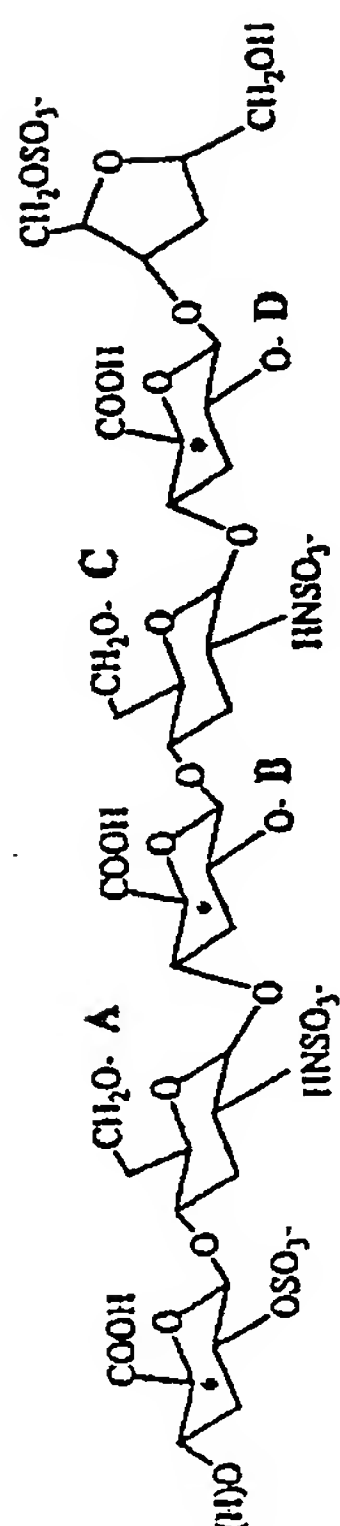
式 (II) の化合物において、還元末端の糖は脱アミノ化されて表示の 2,5-アンヒドロマンノースを形成する。この化合物がさらに還元される場合、表示の CHO は $-\text{CH}_2\text{OH}$ となる；しかし、この還元は、本質的には脱ポリマー化反応において起こらない。この還元体は、本発明の化合物であり、以下の式 (IIa) に示される。

(以下余白)

式 II



式 II(a)



$-\text{SO}_3\text{R}$ において、R で表される陽イオンは、無機陽イオン（例えば、ナトリウムイオン、カリウムイオン、カルシウムイオン、またはアンモニウムイオン）または有機陽イオン（例えば、四級アミンから得られる陽イオン）のいずれかであり得る；これらの塩は簡単な中和によって形成される。

上式 (II) に基づいて、 $-\text{SO}_3\text{R}$ 部分が 2 個またはそれ以上存在する場合、その位置に関して、11 個の異なる可能な立体配置があると考えられ得る。これらの立体配置が次の表に図式的に示される。ここで、「X」は表示の A、B、C または D の位置に $-\text{SO}_3\text{R}$ が存在することを示す。

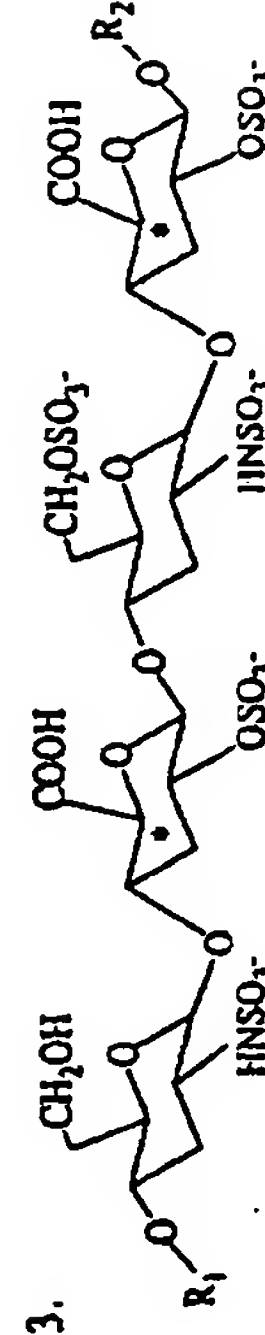
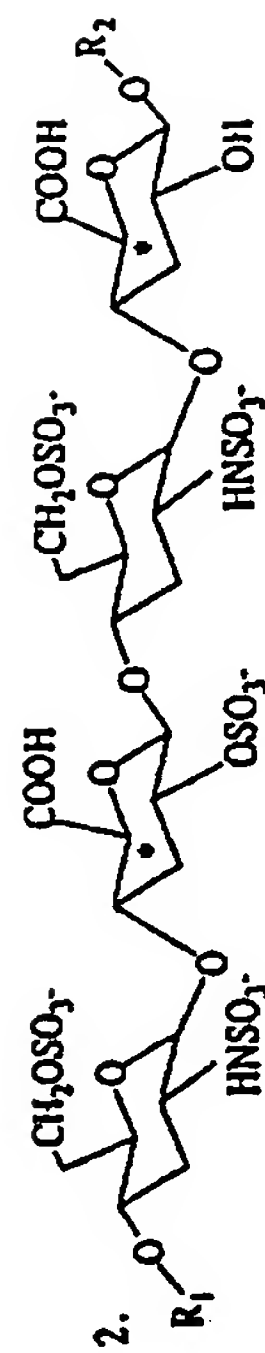
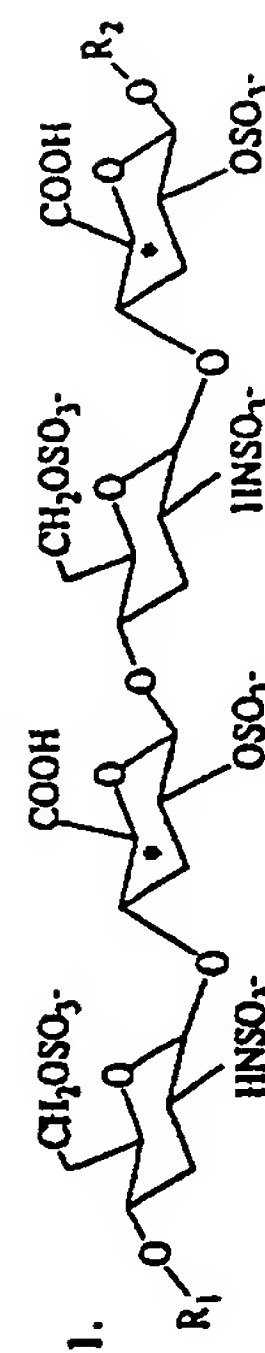
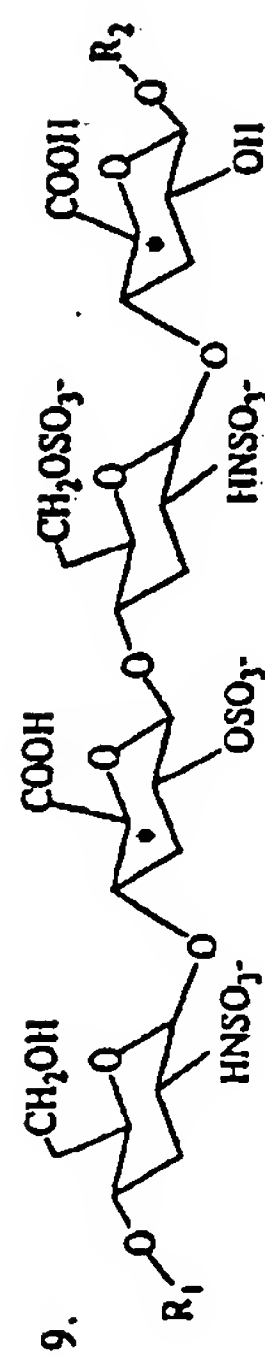
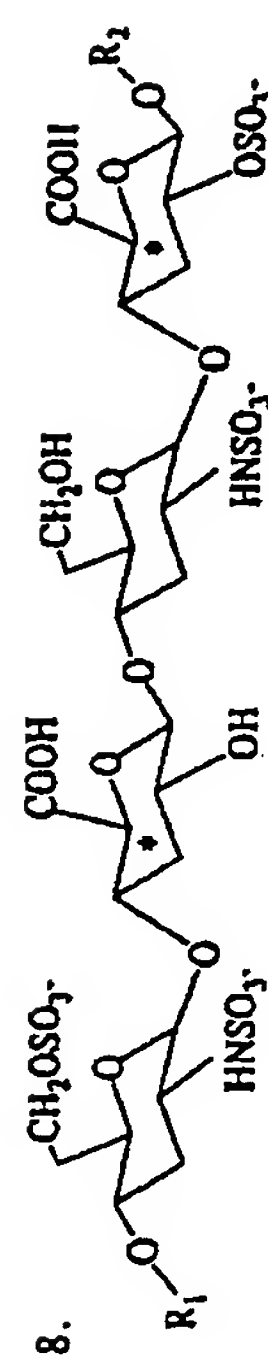
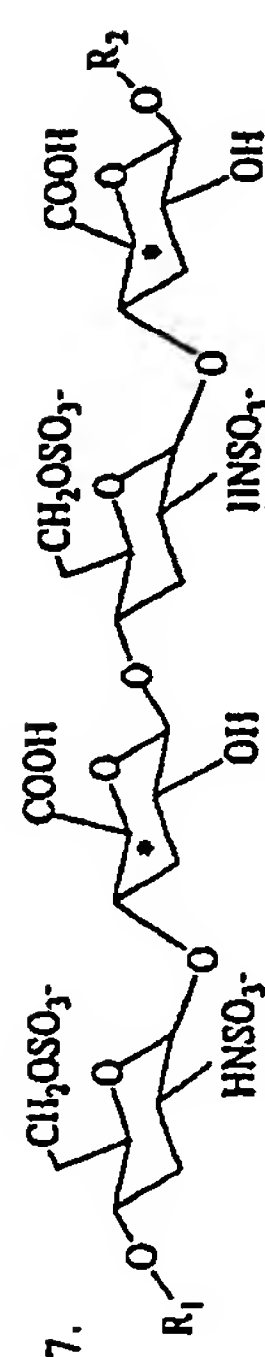
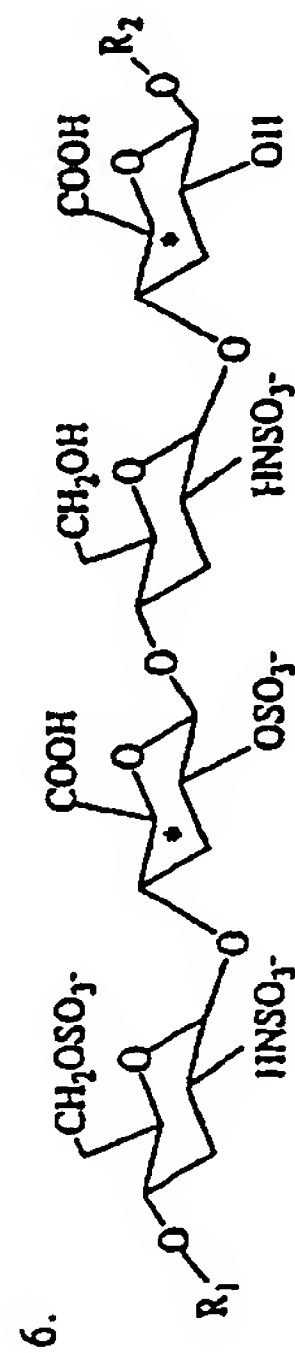
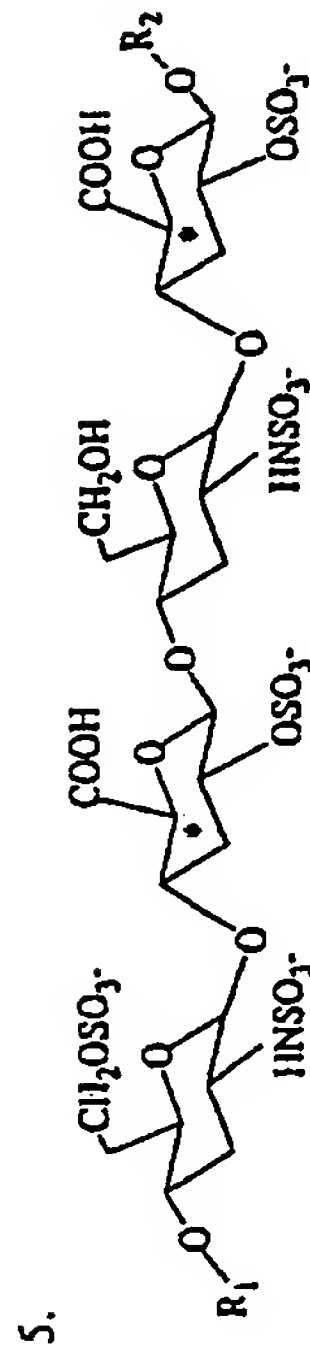
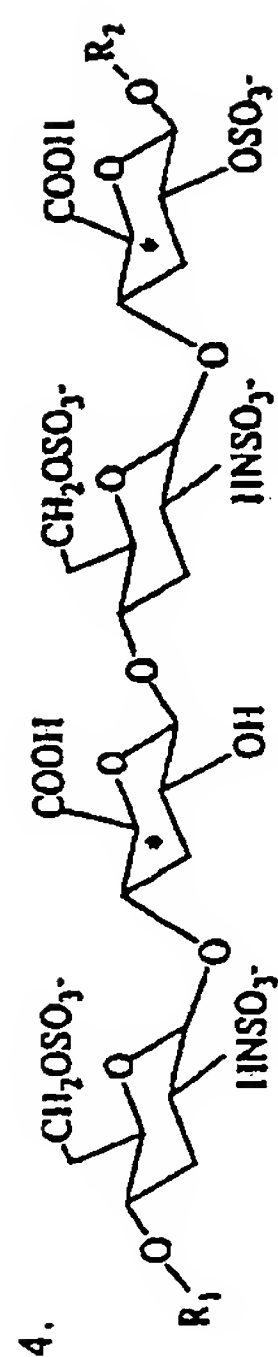
表 1

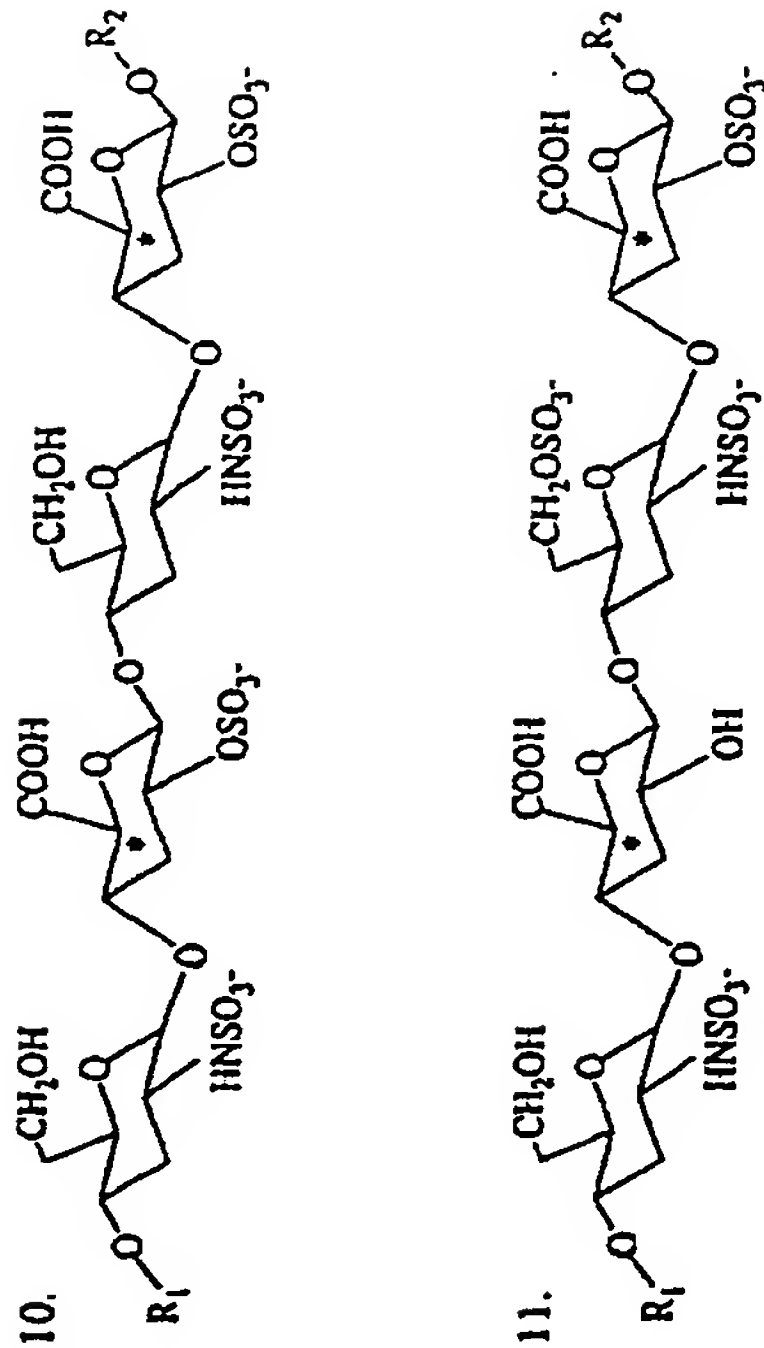
	A	B	C	D	$-\text{SO}_3$
1.	X	X	X	X	
2.	X	X	X		
3.		X	X	X	
4.	X		X	X	
5.	X	X		X	
6.	X	X			
7.	X		X		
8.	X			X	
9.		X	X		
10.		X		X	
11.			X	X	

各「R」が任意の陽イオンである場合、上記11個の可能な構造はかなり多数の化合物、すなわち、酸型および塩型を表す。

式(1)で示される11個の可能な立体配置および上記表の基本構造が以下に示される。構造11(1)~11(11)に関して、糖の3位のヒドロキシル基がより明確にするために省略されたことが指摘される。

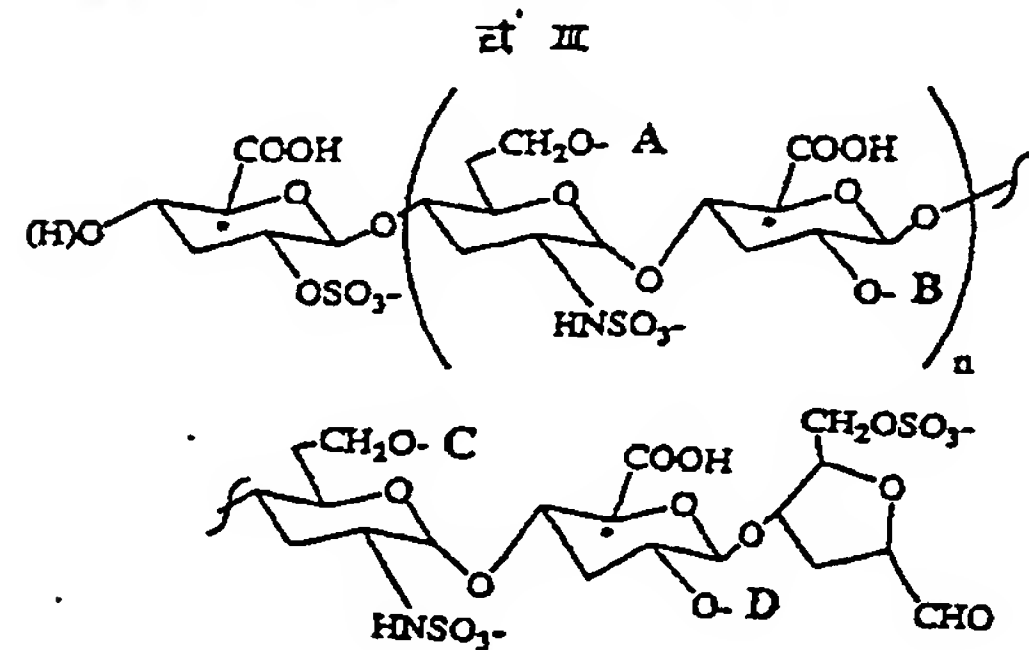
(以下余白)





本発明の代表的な化合物（ここで、Rは上記で定義されたとおりである）は、次のように記述される。これらの表現では次の略語が用いられる：L-イズロン酸 = IdoA；D-グルコサミン = GlcNH₂；N-アセチル-D-グルコサミン = GlcNAc；D-グルコサミン N-硫酸 = GlcNS；2,5-アンヒドロマンノース = Man(2,5)；2,5-アンヒドロマンニール = ManH(2,5)。O-連結硫酸残基の場所は、「S」および硫酸化（SO₃R残基が酸素に連結されている）の位置の番号によって示される。以下に明示のように、αおよびβのアノマー連結は、上記の式1に示される連結の通りであり、上記の表示のDまたはLの立体配置が関係する。硫酸基の場所は、適用される糖の略語の下に示される。

ヘパリンの消化およびそれに続く上記手法によって得られる六糖類および八糖類の断片は、次式の通りであり：



ここで、nは1または2であり、可変基A、B、CおよびDは独立してHまたはSO₃Rであり、ここで各Rは独立してHまたは陽イオンであり、ただし、ここで上記A、B、CおよびDの少なくとも2つはSO₃Rである。上記式IおよびIIにおけるように、糖の3位のヒドロキシル基は、より明確にするため省略され、そしてカルボキシル基の位置の隣の*印は、その立体化学が決まっていないことを示す。

式(III)の化合物において、還元末端の糖は、脱アミノ化されて表示の2,5-アンヒドロマンノースを形成する。この糖がさらに還元される時、表示のCHOは-CH₂OHになる；しかし、還元は本質的には脱ポリマー化反応においては起こらない。還元された化合物は本発明の一部であり、式(IIIa)として以下に示される。ここで、各可変基は上記式IIIにおいてのように定義される。

(以下余白)

Rで表された陽イオンは、無機陽イオン（例えば、ナトリウムイオン、カリウムイオン、カルシウムイオンまたはアンモニウムイオン）または有機陽イオン（例えば、四級アミンから得られる陽イオン）のいずれかであり得、そしてこれらの塩は簡単な中和によって形成される。上記のように、3位

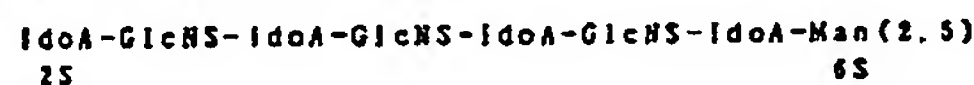
のとドロキシル基は、構造中には示されないが、存在することはわかっている。そしてカルボキシル基の位置の隣りの印は、これらの位置の立体化学が決まっていなことを示す。

上記式(111)に基づいて、-SO₃R部分が2個またはそれ以上存在する場合、その位置に関して、57個の異なる可能な立体配置があると考えられ得る。これらの立体配置が図6A、6Bおよび6Cに図式的に示される。ここで、「X」は、-SO₃Rが表示のA、B、A'、B'、CまたはDの位置に存在することを示し、ここで、A'およびB'は、デヒドロマンノースまたはデヒドロマンニール残基に近接する括弧に入った二糖単位におけるAおよびBの実施態様を表す。

各「R」がHまたは陽イオンであり得るということにおいて、57個の可能な構造はかなり多数の化合物、すなわち酸型および塩型を表す。

この57個の立体配置の基本構造式は、本明細書中には示されていない。しかし、これらの式は式11(1)~11(11)を参照することによって、式111および図6A、6Bおよび6Cから推定され得る。

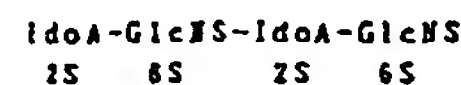
本発明の好ましい化合物は、六糖類である。しかし、好ましい八糖類としては、平滑筋細胞に対する抗増殖活性を有する八糖類を包含し、式



を有する。ここで、中間の -GlcNS-IdoA-GlcNS-IdoA-GlcNS-

IdoA-基における6個の糖のうちの少なくとも2個は、硫酸基を含有し；あるいはその生理学的に受容可能な塩を含有する。

これらのうち特に好ましいものは、八糖類であり、ここで、少なくとも2個のIdoA-GlcNY単位は、



である。

従って、本発明の好ましい八糖類は、次の八糖類、それらの化学的に受容可能な塩、ならびに、2個またはそれ以上のそのような八糖類およびそれらの塩の混合物のいずれもが包含される。



有用性の記述

本発明のオリゴ糖組成物は、過剰なかつ破壊的な平滑筋細胞の増殖を特徴とする状態または病気の治療のための治療上の適用に有用である。これらの状態は、手術患者の場合のように被験体が外傷にさらされているところで、しばしば起こる。創傷または手術によって引き起こされる外傷は、血管の損傷および平滑筋細胞の二次的増殖を引き起こす。この二次的増殖は、血管のレゼノーシス(resenosis)を引き起こす。この望ましくない結果は、血管移植片手術、心臓移植、バルーンまたはレーザーによる血管形成、動脈外傷性損傷、筋性動脈の術後修復、動脈カテーテルの長期間留置、侵襲的な動脈診断法、腎臓移植、肺移植または肝臓移植、冠動脈バイパス手術、頭動脈バイパス手術、大動脈高動脈バイパス手術、および頭蓋内動脈バイパス手術の後に生じ得る。

外傷の結果として起こる平滑筋細胞の二次的増殖という出来事に加えて、ある種の病気は望ましくない血管の増殖に関連しているが、それはこれらの場合も、いくらかの内部の未知の損傷が、二次的な結果を引き起こすことが推測されるからである。これらの病気の状態は、グッドパスチャー症候群、急性糸球体腎炎、新生児肺高血圧、喘息、うっ血性心不全、成人肺高血圧、および腎血管性高血圧を包含する。

これらの病気および状態にもかかわらず、適切な量の本発明組成物の投与は、治療に有用である。投与は多糖類組成物によって適切な典型的な経路によるものであり、一般的に注

射によるような全身投与を包含する。特に好ましい投与は、長期間にわたる持続的な注射が容易に持続され得るような、静脈注射である。典型的な投与量の範囲は、5~30日間、好ましくは7~14日間にわたって、一定の基準で0.1~10mg/kg/時間の範囲である。特に好ましい投与量は、約0.3mg/kg/時間、または70kgの成人に対して、21mg/時間または540mg/日である。

投与の他の方式は、あまり好ましくないが、より便利であり得る。静脈注射に比べて、より低用量での皮下注射またはわずかに高用量での経口投与、または経膜(transmembrane)的投与または経皮投与、または局所的な損傷に対する他の局所投与もまた、有効であり得る。支持マトリックスのような、おそらく血管移植片物質内に含まれる連続性放出デバイスを紹介する局所投与は、外傷の位置が影響されやすいところでは特に有用である。

前記の投与方式に対して適切な製剤は、当該分野において公知であり、そして製剤の適切な概要は、Remington's Pharmaceutical Science, Mack Publishing Company, Easton, PAの最新版に見い出される。

本発明の組成物はまた、放射性標識、蛍光標識、発色基または酵素のような典型的な方法を用いて標識され得、そして生物学的試料中の抗増殖成分の量に対する競合的アッセイにおいて用いられ得る。生物学的試料中の分析物の競合的アッセイのための適切なプロトコールは、当該分野においてよく知られており、そして一般的に、標識された競合物質との混

合において、代表的には免疫グロブリンまたはその断片のような分析物と反応する特異的な結合相手との混合において、試料の処理を包含する。本発明に従って調製される抗体は、この目的に有用である。分析物と競合物質の抗体への結合は、結合した複合体を除去することおよび複合体または標識の上清のいずれかを分析することによって測定され得る。分離は、固体支持体に対する特異的な結合相手の予備結合によってより容易に行われ得る。そのような技法は、当該分野においてよく知られており、そしてそのような競合的アッセイに利用可能なプロトコールは、数が多いで、かつよく知られすぎて本明細書中では詳細に述べることはできない。

本発明の抗体は、試料における標識された組成物と分析物の抗増殖因子との間の競合を包含する上記タイプのイムノアッセイだけでなく、この因子に対する直接的イムノアッセイにおいてもまた有用である。直接的なアッセイを包含する他のプロトコールもまた、多くの種類があり、よく知られている。典型的には、抗体に結合する分析物は、標識を有するさらなる反応相手により、または他の検出法により検出される。それゆえ、代表的なサンドイッチアッセイにおいて、例えば、本発明抗体の分析物への結合は、これらの同じ抗体の標識調製物とのさらなる反応によって、または種の違いによりこの調製物と免疫反応する標識抗体によって検出され得る。

本発明の抗体はまた、薬学的組成物中に製剤化され得、かつ被験体における平滑筋細胞の成長を刺激するために使用さ

れ得、そして被験体に対してこの結果は望ましい。

実施例

本発明の化合物および組成物をいかに調製するかを当業者に対して完全に開示し、説明するために以下の実施例を述べるが、これらは発明者が発明に対する認識を制限することを意図するものではない。使用される数字（たとえば、量、温度等）の正確さには注意を払ったが、いくらかの実験誤差および偏差は存在する。特に断わりのない限り、部は重量部、温度は摂氏、そして圧力は常圧付近である。

実施例 1

六糖類および八糖類ヘパリン断片の調製

160 mlの水に溶解したヘパリン20 gに、脱アミノ化混合物中の最終HONO濃度が50 mMとなるように固形の NaNO_2 690 mgを加えた。混合物をマグネティックスターラーで攪拌しながら、約70 mlの6M HClを滴下して加えた。pHが1.5までゆっくりと下がり、6M HClまたは2M Na_2CO_3 のいずれかを滴下して加えることにより1.5に維持した。最初に、この酸の添加により、反応混合物は黄色に変色したが、その反応が終ると（ N_2 の放出が止まるまで約8分間）、溶液は透明になった。反応が完了したときに、2M Na_2CO_3 を加えて最終pHを8.5にまでした。時折現れる微細な白色沈澱を遠心分離して除去し、上清液をデカンテーションにより除き、減圧下で脱気し、次いで直接バ

イオゲル(BioGel)P10カラム上にかけた。

バイオゲル(BioGel)クロマトグラフィーを行うために、それぞれ直径約5 cmおよび長さ約128 cmの2本のカラムを直列につなぎ、それに計5リットルのバイオゲルP10を充填した。カラムを準備し、0.5M NH_4HCO_3 を毎分0.7 mlの流速で流した。脱アミノ化混合物は可能な限り最小容量(160 ml未満)でカラムにかけた。18 mlの画分を集め、そしてカルパゾール法により分析した。個々のピークの画分を一緒にし、 NH_4HCO_3 を除去するために長時間凍結乾燥した。高分子オリゴ糖は早く溶出し、二糖類は最後に溶出するという順で、二糖類、四糖類、六糖類、八糖類、十糖類、および高分子オリゴ糖の混合物を含有するピーク群が得られた。

実施例 2

平滑筋増殖に対する効果

試験される溶液は、10 %ウシ胎児血清およびペニシリン/ストレプトマイシンを含有するDMEM培地である「完全培地」中に作った。

ウシ平滑筋細胞(SMC)を、Ross, B. J., *Cell Biol* (1971) 172-186の方法によりウシ肺動脈から単離した。3-10回の継代から得たSMCを上記の培地中で96ウェルマイクロタイタープレートに、1ウェル当たり350-700細胞ずつプレートし、そして2-4時間付着させた。この完全培地を0.1 %ウシ胎児血清を添加したDMEMで置き換え、さらに24-72時間インキュベ

トして細胞成長を停止させた。次に、低血清培地を試験試料を含有する完全培地で置き換えた。

一定の間隔で試料を与えたレプリケートプレートを用いて、細胞を7日間まで成長させた。細胞数は、培地を除去し、細胞をリン酸緩衝化生理食塩水で洗浄し、75-150 μl の細胞溶解緩衝液を加え、Bradley, B.ら, *J Biol Chem* (1987) 262:6431に記載の乳酸脱水素酵素(LDH)活性をアッセイすることにより決定した。LDH活性は細胞数に比例する。

四糖類から十四糖類画分のサイズの範囲のオリゴ糖についての1つのそのようなアッセイの結果を図2に示す。これらの結果は、六糖類および八糖類画分が抗増殖アッセイにおいて活性であることを示している；四糖類画分は実質的にあまり活性はないようである。高分子量断片もまたこのアッセイでは活性であるが、六糖類の長さおよびそれ以上の長さの断片は、重量/容量の濃度基準ではヘパリンに匹敵する活性を有しており、そしてそれよりも短いオリゴ糖はより都合よくデノボ(de novo)合成を行いやすい。それゆえ、抗増殖活性を示し得る最小単位が重要である。

図2に示されるように、増殖の80 %阻害は、15 $\mu\text{g/ml}$ という低い濃度の八糖類画分に見られる。これに匹敵する阻害は、約60 $\mu\text{g/ml}$ の六糖類画分により示される。

実施例 3

六糖類および八糖類の陰イオン交換分離

実施例 1 によって得られた六糖類および八糖類の固分を、0.1M NH_4HCO_3 中で充填された DEAE-トヨパール の $1 \times 7 \text{ cm}$ のカラムを用いて、陰イオン交換クロマトグラフィーにかけ、そして、0.01 M から 1.0 M の直線濃度勾配の NH_4HCO_3 (総容量 = 600 ml) を用いて展開させた。各オリゴ糖混合物の約 20 mg をカラム上にかけた。

図 3 A および図 3 B に、六糖類および八糖類に対するそれぞれ結果を示す。溶出液を図 3 A および 3 B に示されるように等量の 5 つの固分に分け、実施例 2 の方法に従って平滑筋増殖の阻害能力に対してアッセイした。このアッセイの結果を図 4 A および 4 B に示す。

図 4 A に示されるように、平滑筋増殖の阻害能力は電荷と相関関係にあるようであり、最も電荷の高い固分はかなり効果が高い。いずれのカラムでも早く溶出した固分は、実質的な抗増殖活性を有しないようである。しかし、陰イオン交換体に対して高い親和性を有する固分は非常に高い効果を有する。例えば、六糖類混合物の場合、このアッセイでは、電荷の最も高い 4 つの固分のいずれもおおよそ $75 \mu\text{g/ml}$ の濃度で、市販のヘパリンを用いて得られる最大阻害値の 60% と同等の平滑筋増殖の阻害を与える；八糖類の陰イオン交換分離の電荷の最も高い 4 つの固分は、 $15-30 \mu\text{g/ml}$ で約 60-80 % 阻害し得る。

0.3M NH_4HCO_3 中で充填された $5 \text{ cm} \times 21 \text{ cm}$ のカラムを用いて、より大きな規模で、DEAE-トヨパールクロマトグラフィーを行

った。3 g までのオリゴ糖混合物をこのカラムにかけ、そしてこのカラムを 2 リットル容量の 0.3 M、0.5 M、.06 M、0.9 M および 1.2 M の NH_4HCO_3 で順次流した。0.9M NH_4HCO_3 中に現れる固分は、より小さなカラムから得た最も高度に硫酸化されたプールと同等であり、最初のオリゴ糖混合物に対して約 150 mg/g の収率で回収される。

実施例 4

逆相イオン対 HPLC

未分離の六糖類および実施例 3 で DEAE-トヨパールカラムから得られた最も高い電荷特性を有する六糖類固分を、Guo, Y. ら, *Anal Biochem* (1988) 168:54-62 に記載のように、逆相イオン対 HPLC にかけた。これらの手法の溶出パターンを図 5 A および 5 B に示す。

図 5 A は、DEAE-トヨパールの最も電荷の高い断片の溶出プロフィールを示している。図 5 B は、全量の六糖類固分を用いた結果を示している。これらのプロフィールの比較が示すように、電荷で分離された固分は非常に単純化された混合物である。この単純化された混合物の個々の成分は、抗増殖活性を有することが予想される。

より電荷の高い断片は、一般に、(あまり電荷の高くない断片および/または市販ヘパリンと比較して)、(1)より強い平滑筋細胞の増殖阻害能、および(2)より低い抗凝固剤としての作用能を示す。さらに、分画/分離のプロセッシングを行い得、

それは(1)および(2)の要因を改善し、そしてまたそれと同時に、3 位が硫酸化されたオリゴ糖を含有する固分を除去するのを助ける。グルコサミンが抗凝固活性を有するためには、3 位で硫酸化されていなければならないことが指摘される。本発明の好ましいオリゴ糖断片は(1)および(2)の特徴を有し、(3)高い電荷を有し、(4)市販ヘパリンの断片と比べて 3 位で硫酸化された糖を非常に少量含有する(または全く含有しない)。そのような好ましいオリゴ糖を得るために、それらをヘパリンの消化から得るよりもむしろ合成によりそれらを生産した方が好ましい。

実施例 5

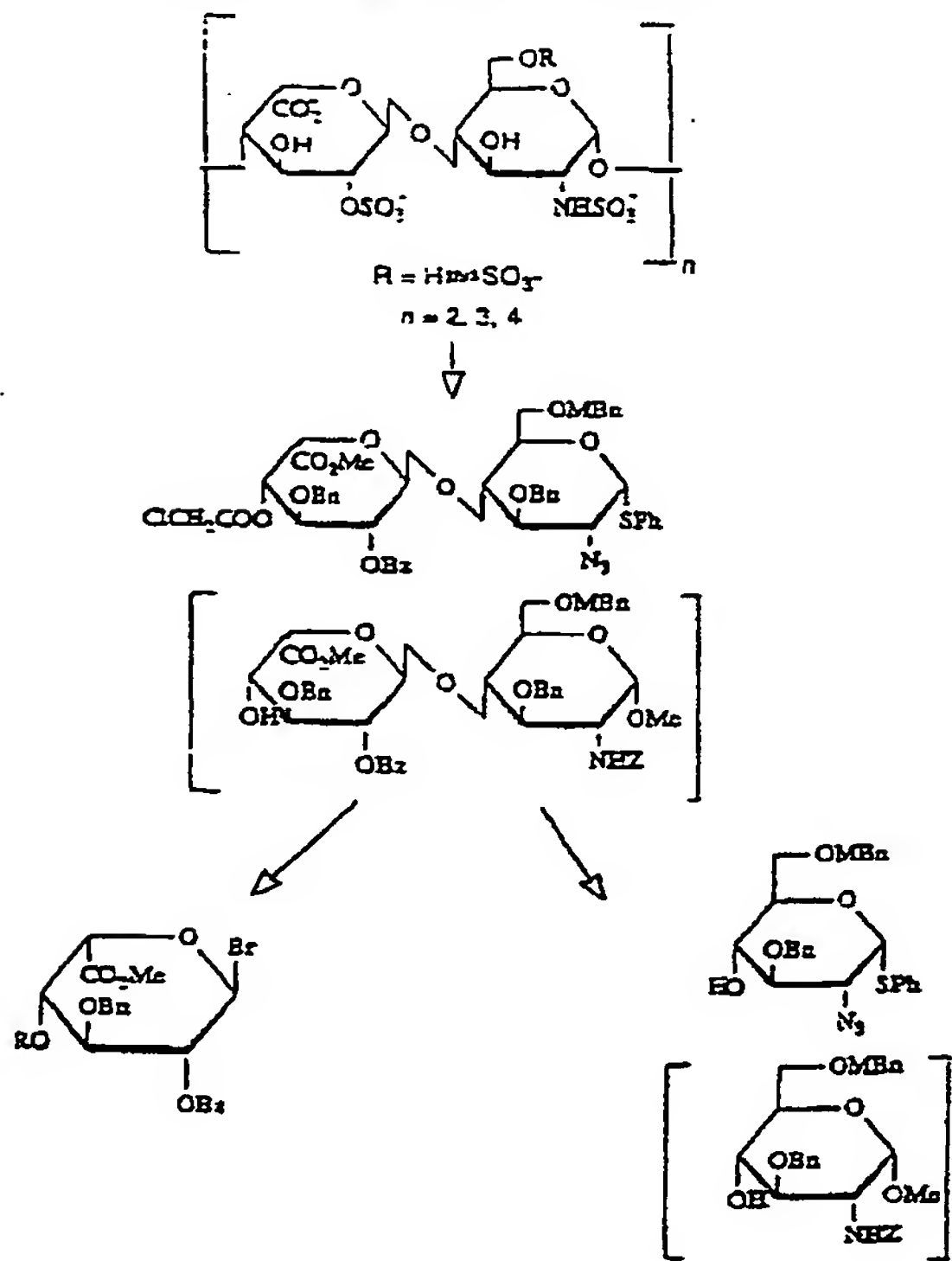
好ましいオリゴ糖の合成

上記のように、特に好ましい本発明のオリゴ糖は、多くの異なった特徴がある。例えば、平滑筋細胞の増殖阻害能がより高いこと、また抗凝固剤としての作用能がより低いこと、硫酸化の程度が高いこと、および 3 位が硫酸化されていないことである。ヘパリンを消化し、次いで上記の方法に従って得られた断片を分離することにより、そのような特に好ましいオリゴ糖を得ることはできるが、化学的合成方法論を用いてそのような特に好ましい断片を得ることが好ましい。化学的合成方法論は、すべてが同一の構造であり、それゆえ同一の特徴を有する高純度の反応生成物を得ることを可能にする。次の図は、特に好ましいオリゴ糖の合成を示す流れ図である。

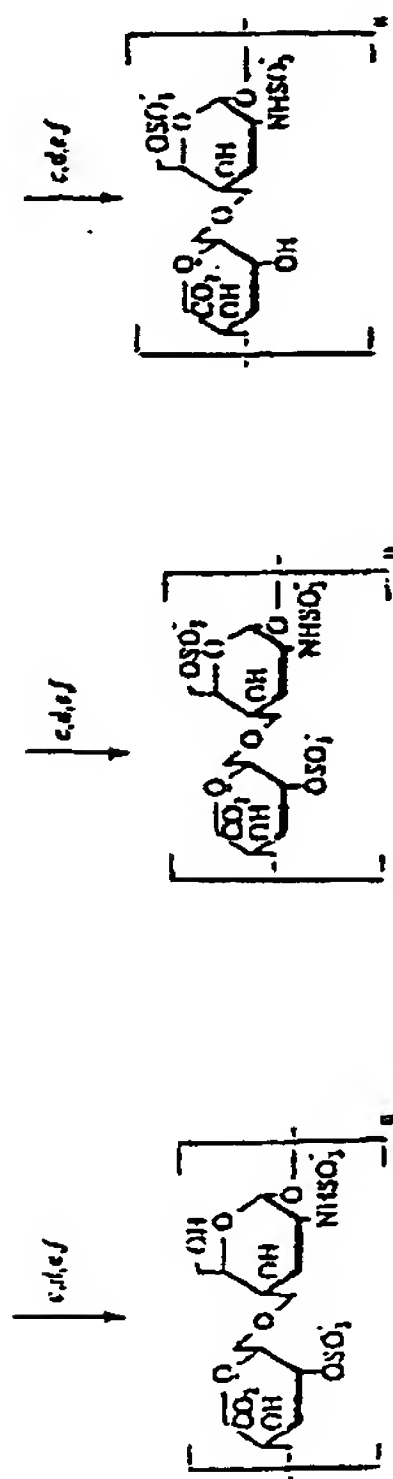
下記の構造の合成スキームの終りのところで、そのような合成を行う方法を説明する記述が付されている。

(以下余白)

特許出願の糖を基として得られる糖の合成法

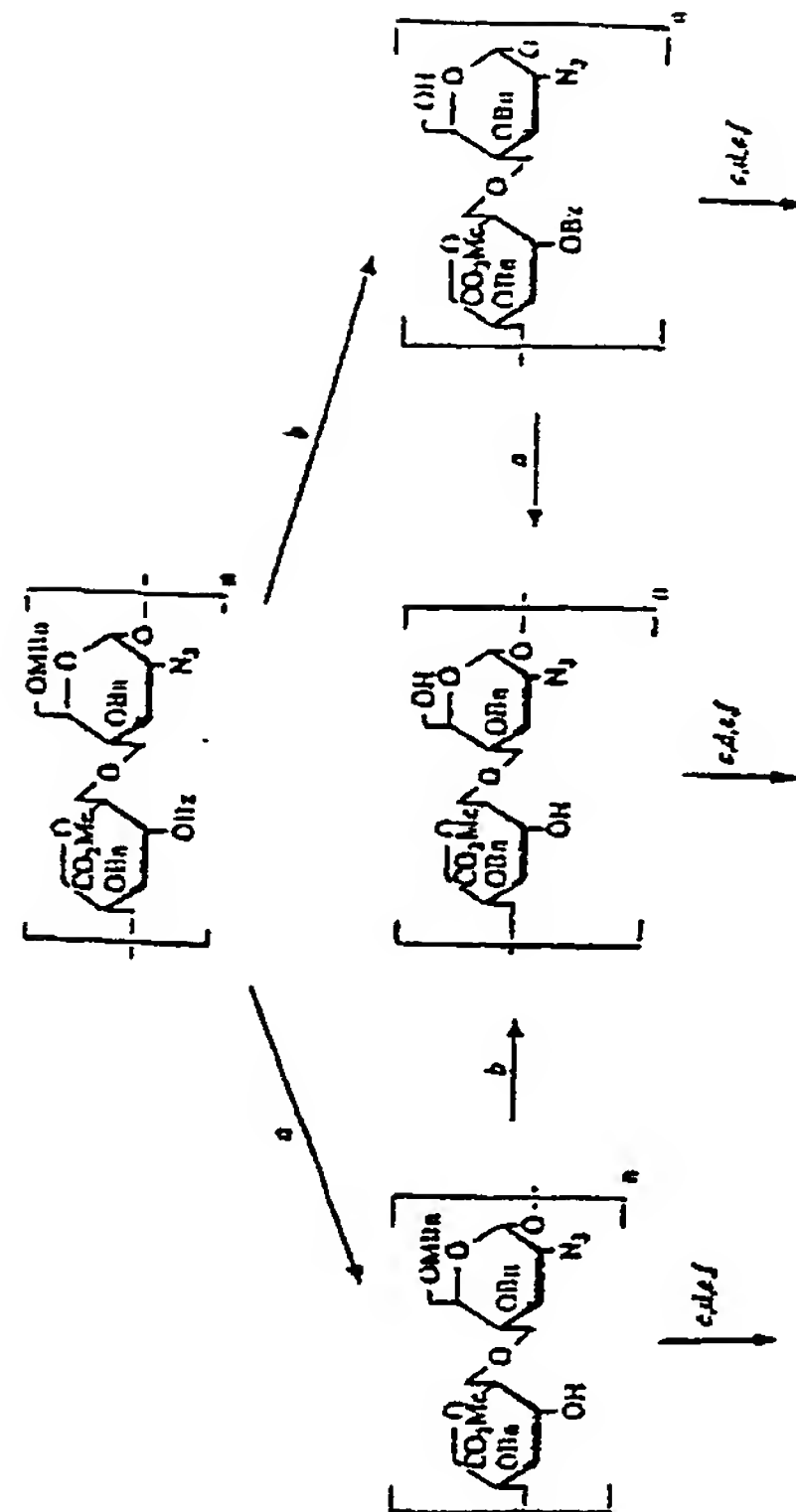


特許出願の糖を基として得られる糖の合成法

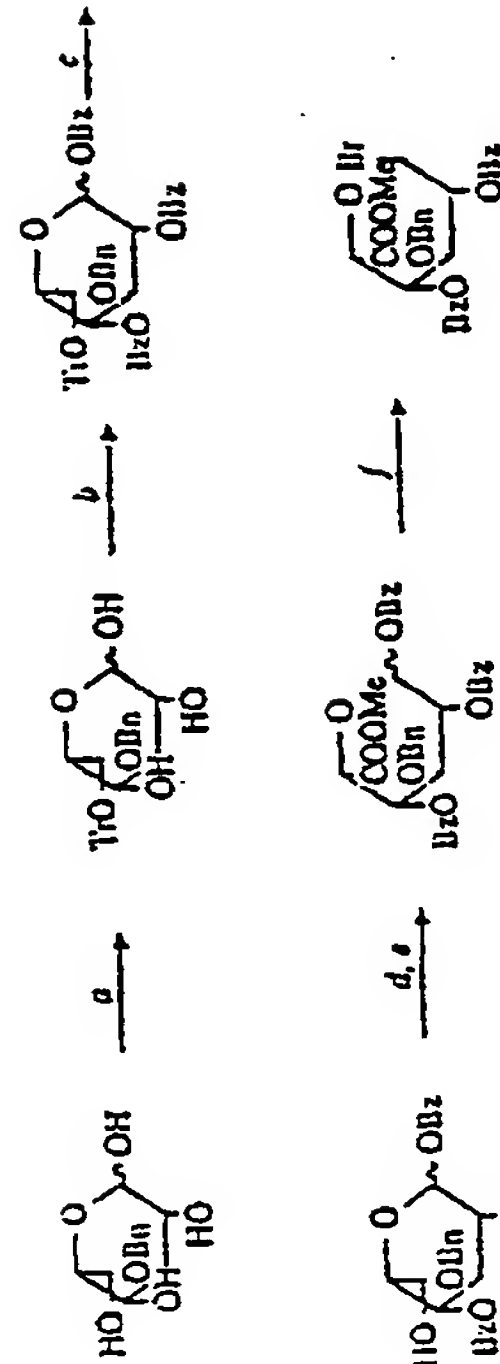


特許出願の糖を基として得られる糖の合成法

特許出願の糖を基として得られる糖の合成法

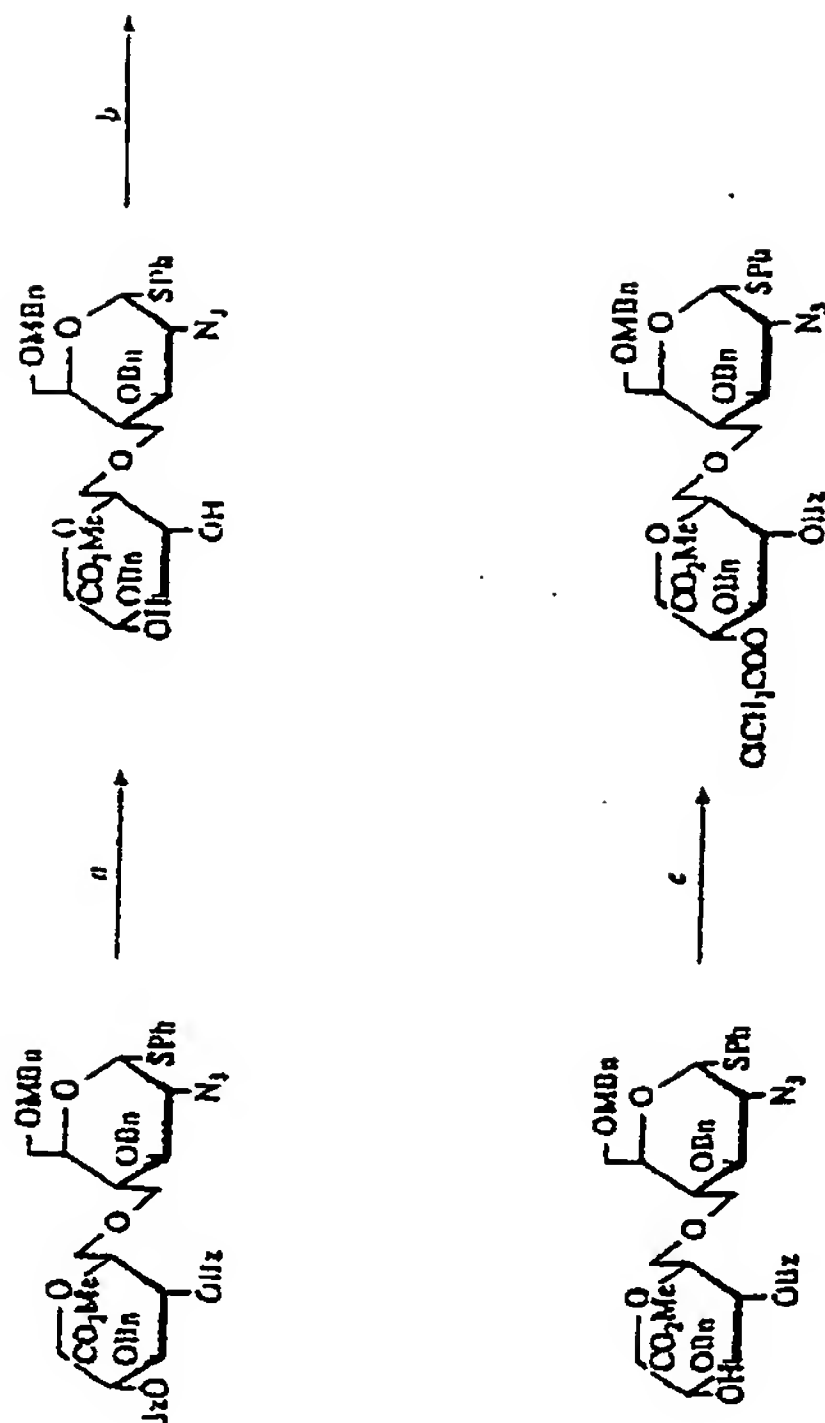


特許出願の糖を基として得られる糖の合成法



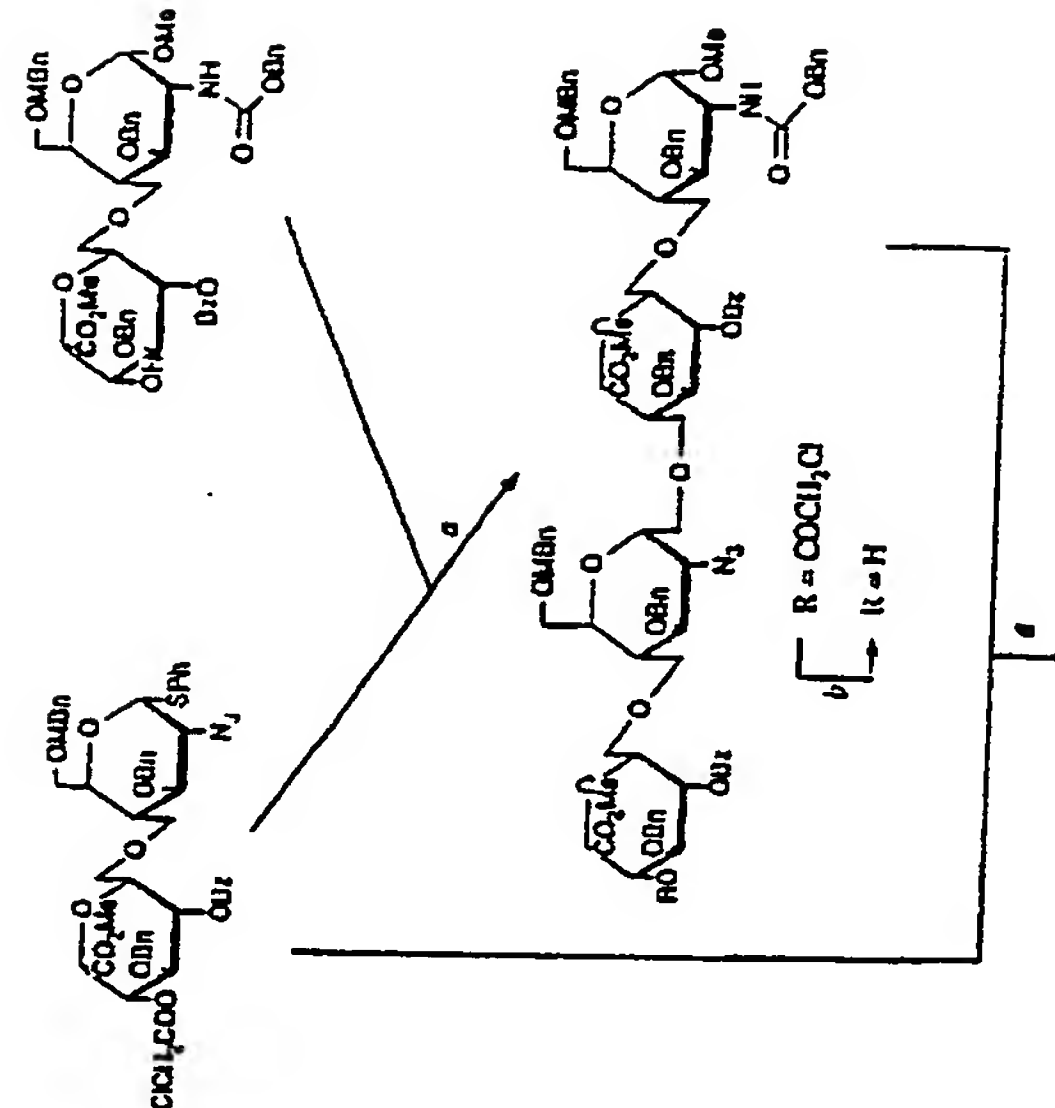
a) $TiCl_4$, Py ; b) $BzCl$, Py ; c) $SOCl_2$, $AcOH$; d) CrO_3 , Tea ; e) CH_3N_2 , CH_2Cl_2 ; f) $TBBr_4$

内部二糖類シントンの官能化

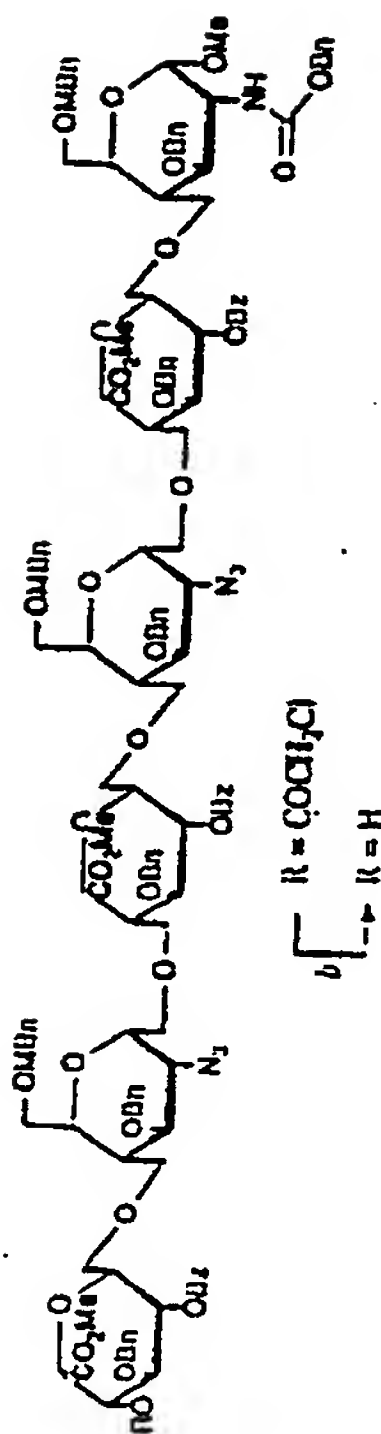


a) NaOMe, MeOH; b) AcCl, Py; c) AcCl, Py, CH₂Cl₂

保護化 大糖類の合成



保護化大糖類の合成 (続き)



a) NaOMe, MeOH; b) AcCl, Py; c) AcCl, Py, CH₂Cl₂

特に好ましいオリゴ糖の逆合成

それらのサイズに関係なく、またはそれらのグルコサミン単位が0-6位で硫酸化されているかどうかに関係なく、オリゴ糖を共通に保護化された二糖類単位に逆合成し得る。この二糖類単位は両方向に鎖を延ばすことができる; そのチオグリコシド官能基は還元末端への鎖の延長を可能にするが、一時的なクロロアセチル基による0-4'位の保護化によって非還元末端へのさらなる鎖の延長が可能である。目標化合物のアミノ基はアジド基としてマスクされ、グリコシル化反応における都合のよい立体制御を確実にする。ベンジル(Bn)基は、目標化合物では硫酸化されていないヒドロキシル基に対して永久的なブロッキング基として使用され、そして半永久的なベンゾイル(Bz)基は硫酸化されるべきOHに対して使用される。p-メトキシベンジル(MBn)基は、目標化合物では任意であるヒドロキシル基の硫酸化に耐える。

二糖類シントンは、保護化2-アジド-2-デオキシ-グルコピラノシル誘導体をイソプロピルプロパミドでグリコシル化することにより利用されるべきである。

すべての目標オリゴ糖はこの単一の二糖類シントンから合成し得るが、還元末端という特殊な場合には、このシントンを別の二糖類単位で置換し得る(括弧内に示す)。この別の二糖類単位には還元末端にメチルグリコシドがあり、ベンジルオキシカルボニル(Z)基により保護されているアミノ基がある。この二糖類は、同じイソロン酸供与体を括弧内に示されるグ

ルコサミン誘導体とカップリングすることにより合成し得る。

この逆合成は、新規で、かつ特に有利なブロック基の戦略を包含し、それは、硫酸化オリゴ糖の以前の合成とは対象的に、同じ保護化誘導体からの異なった硫酸化パターンを用いたオリゴ糖の調製を可能にする。

アシル型(ベンゾイル)保護基とp-メトキシベンジル基の組合せは、任意の順序で、特異的脱保護および続いての硫酸化を可能にし、それは以下の位置: a) 保護化誘導体においてベンゾイル基でマスクされた位置; b) 保護化誘導体においてp-メトキシベンジル基でマスクされた位置; および c) 保護化誘導体においてベンゾイル基およびp-メトキシベンジル基の両方でマスクされた位置に硫酸基を有する構造に通じる。

さらにp-メトキシベンジル基の使用によるさらなる利点は、この基の選択的除去が必要でないならば、永久的ベンジル基と同じ工程において触媒による水素添加により除去し得、それにより必要な合成工程を減らせるということである。

イズロン酸供与体の合成のため、3-O-ベンジル-L-イドース(本明細書に参考のために援用される、van Boeckel, C. A. A. ら、Carbohydr. Chem. (1985) 1:293)をピリジン中でトリチルクロライドでトリチル化し、そしてその生成物は、単離されることなく、ベンゾイルクロライドを反応混合物に加えることにより直接ベンゾイル化した。トリチル基を酸加水分解により除去し、そして一級ヒドロキシル基をクロム酸で酸化し、続いて得られたカルボキシル基はジアゾメタンでエステ

ル化した。グリコシルプロマイドへの変換は、チタンニウム(IV)プロマイドによって行われた。

グルコサミンシントンの合成のため、2-アジド-2-デオキシ-0-グルコースパーアセテート(本明細書に参考のために援用される、Paulson, H. ら、Chem. Ber. (1978) 111:2334)をヒドラジンアセテートを用いて選択的脱アセチル化(本明細書に参考のために援用される、Excoffier, G. ら、Carbohydr. Res. (1978) 59:368)により3工程でチオグリコシドに変換した。次いで、得られたヘミアセタールをクロライドに変換し、そして続いてチオグリコシド化した。Zemplen-脱アセチル化によりアセチル基を除去し、そしてアセタール交換反応により、4,6-O-p-メトキシベンジリデンアセタールを調製した。3-OH基をベンゾイル化し、そして4,6-O-アセタール基を NaCNBH_3 -トリフルオロ酢酸(本明細書に参考のために援用される、Jobansson, R. ら、J. Chem. Soc. (1984) 1:2371)により還元的に開環した。

還元末端のグルコサミンシントンを、p-メトキシベンジリデン化、ベンジル化、および還元の開環により、メチル2-ベンジルオキシカルボニルアミノ-2-デオキシ- α -D-グルコピラノシド(本明細書に参考のために援用される、Horns, E. ら、Chem. Ber. (1955) 88:188)由来の類似配列により合成した。

2-アジド-および2-ベンジルオキシカルボニルアミノ-2-デオキシ-0-グルコース誘導体と、同じイズロノシルプロマイドとのカップリングを、反応増地の緩衝液としてコリジンを組

み合わせてシルバートリフレートを用いて行い、そして二糖類を生成した。

両方の二糖類をさらに二糖類シントンの官能化した。その化合物を脱ベンゾイル化し、そしてO-2'位に単一のベンゾイル基を導入した。その二糖類チオグリコシド誘導体の場合では、ベンゾイル化の後にO-4'位のクロロアセチル化を行った。

2つの二糖類シントンを、ジメチル(メチルチオ)スルホニウムトリフレート(本明細書に参考のために援用される、Fugedi, P. ら、Carbohydr. Res. (1985) 149:C9)(DMST)を用いることによりカップリングし、必要な α -糖鎖間連結を有する四糖類を与えた。

クロロアセチル基の選択的除去とそれに続く同じ二糖類供与体を用いてのグリコシル化は、保護化六糖類を与え、そしてその保護化六糖類を前述のようなさまざまな方法で硫酸化し、次いで脱保護し得る。

上記の開示および/または、オリゴ糖の合成方法を開示するために、本明細書に参考のために援用される、1990年7月24日発行の米国特許第4,943,630号とを組み合わせる参照すれば、当業者には、他の合成方法は明らかとなり得る。

本発明は特定の実施態様に関して記載されているが、本発明の真の精神および範囲から外れることなく、種々の変更が行われ得、そして同等のものが提供され得ることが当業者には理解されるべきである。さらに特定の状況、物質、物質の

組成物、プロセス、プロセス工程または工程を、本発明の目的、精神および範囲に適合させるために、多くの改変が行われ得る。すべてのそのような改変は、本明細書に添付される請求の範囲の範囲内にあることが意図される。

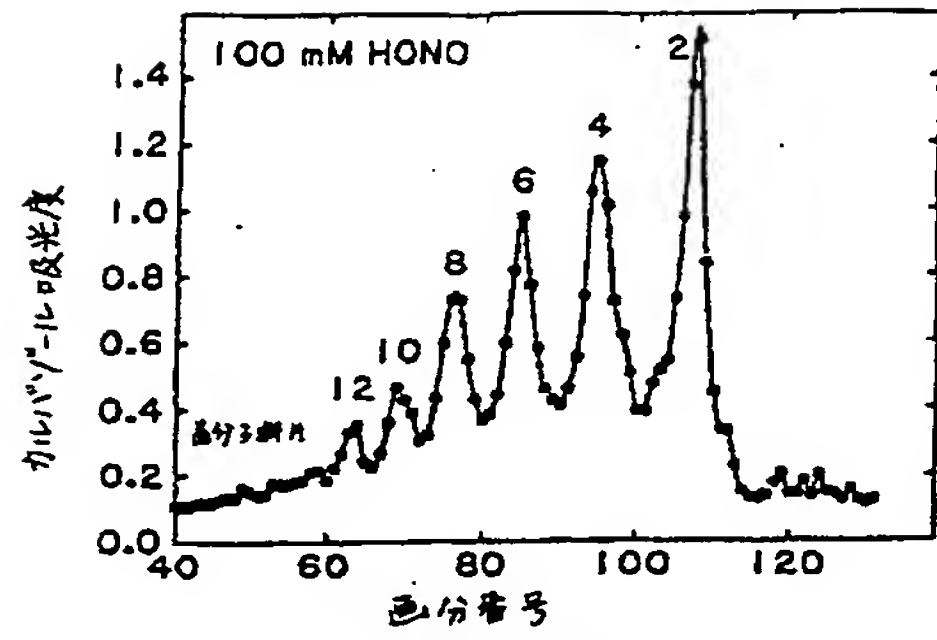


FIG. 1A

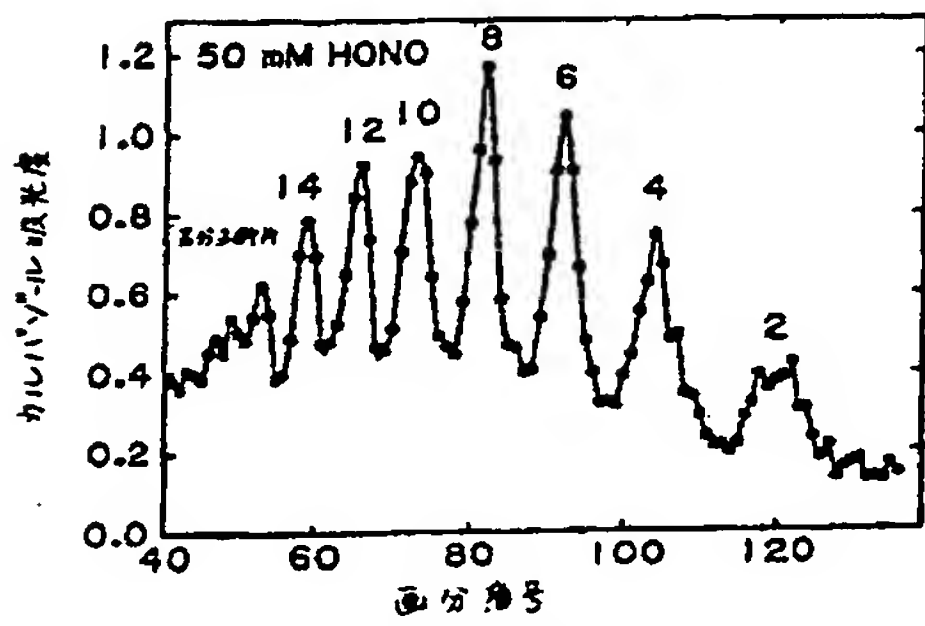


FIG. 1B

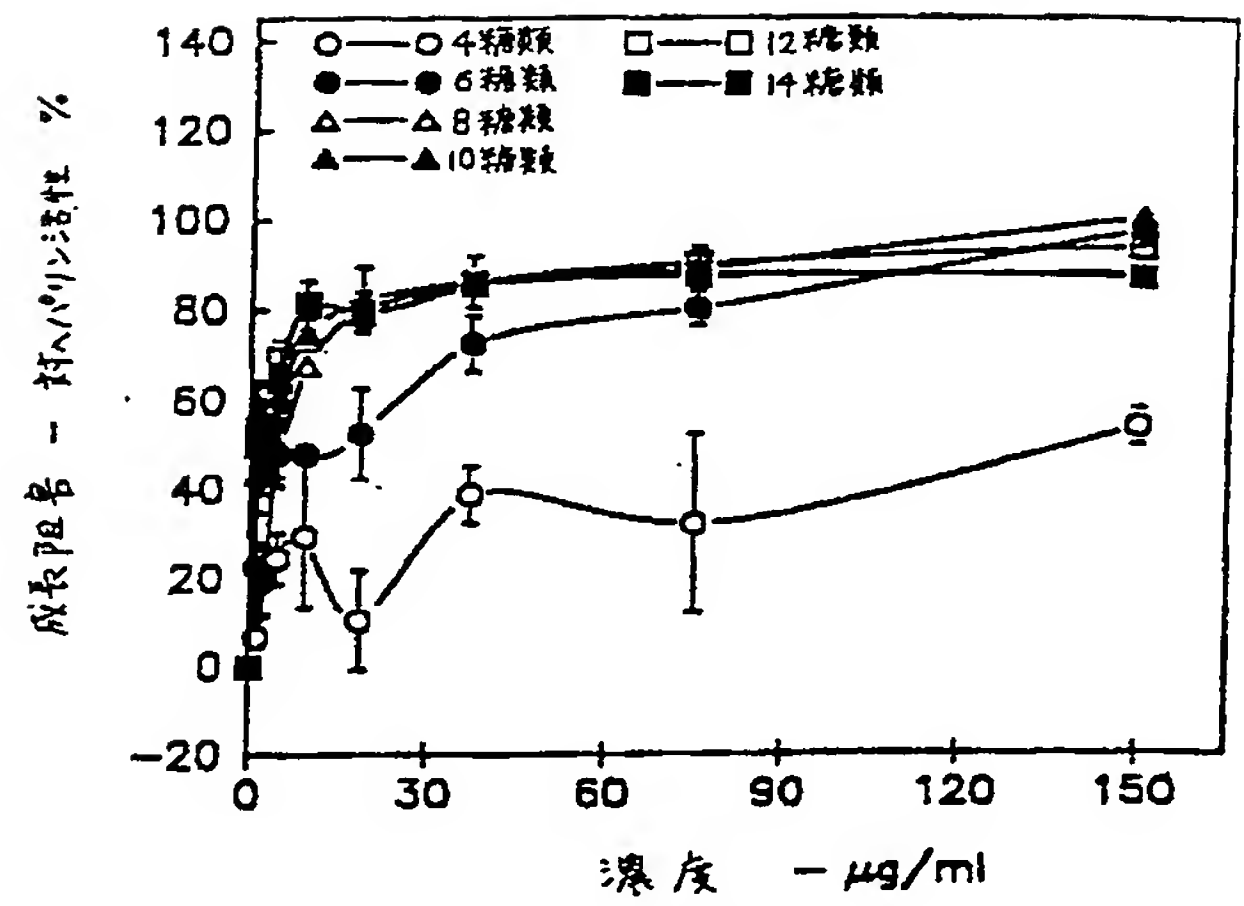


FIG. 2

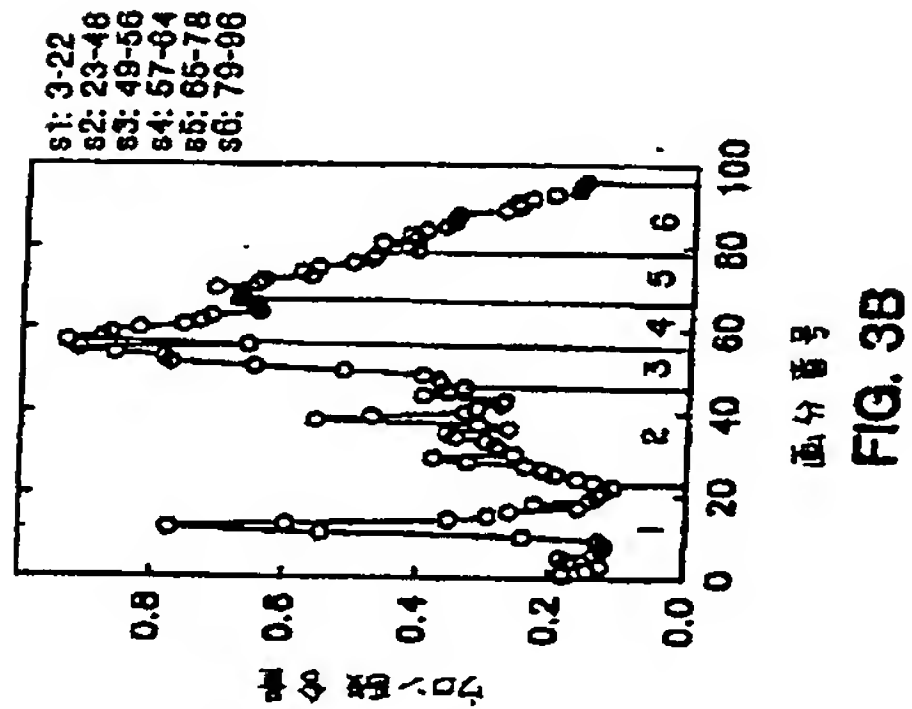


FIG. 3B

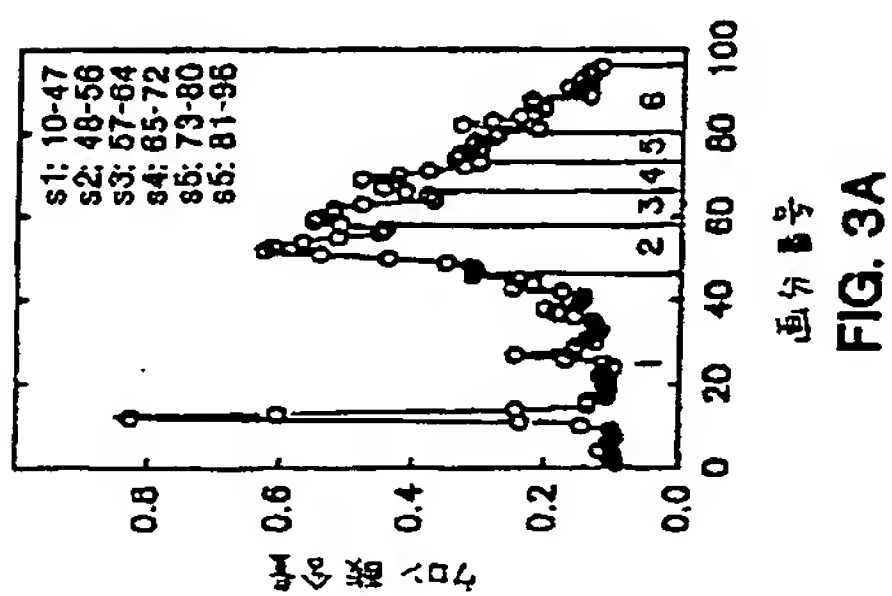


FIG. 3A

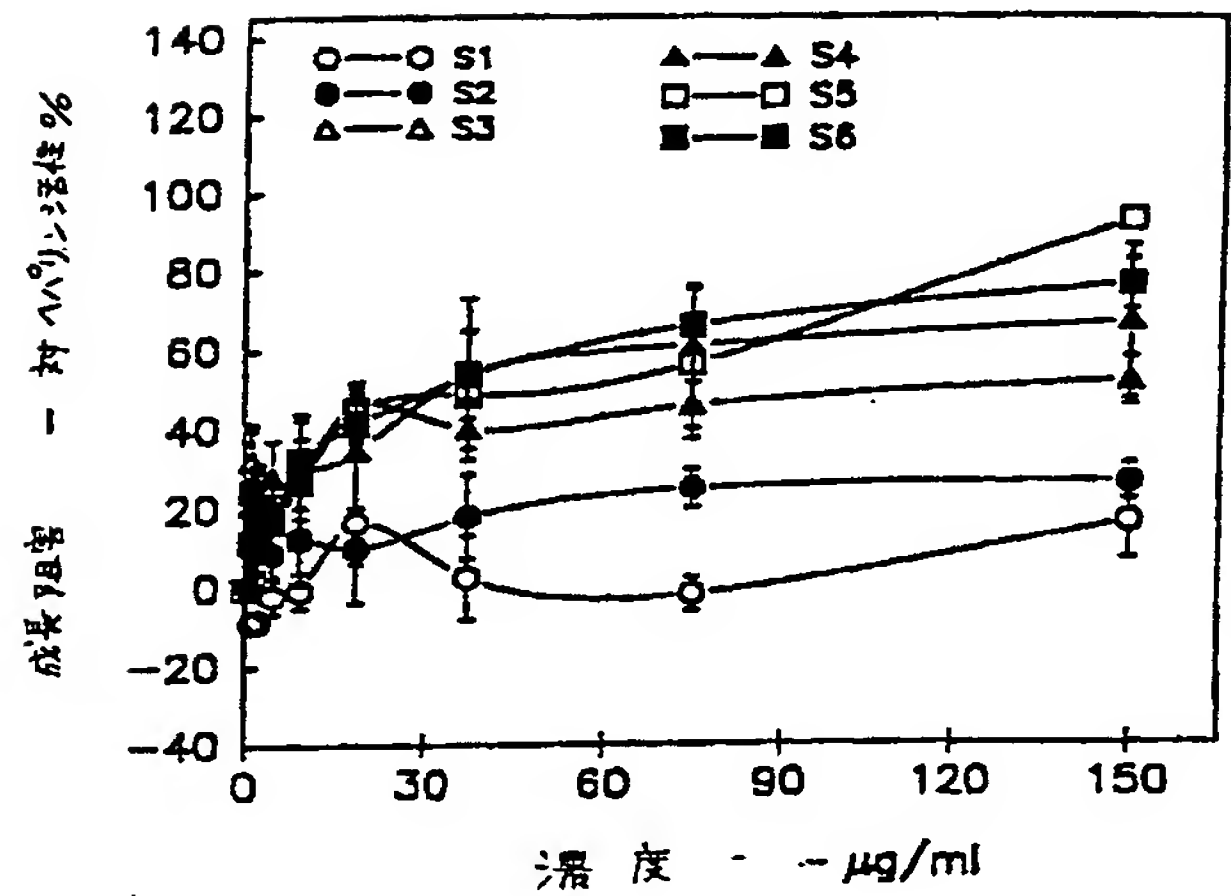


FIG. 4A

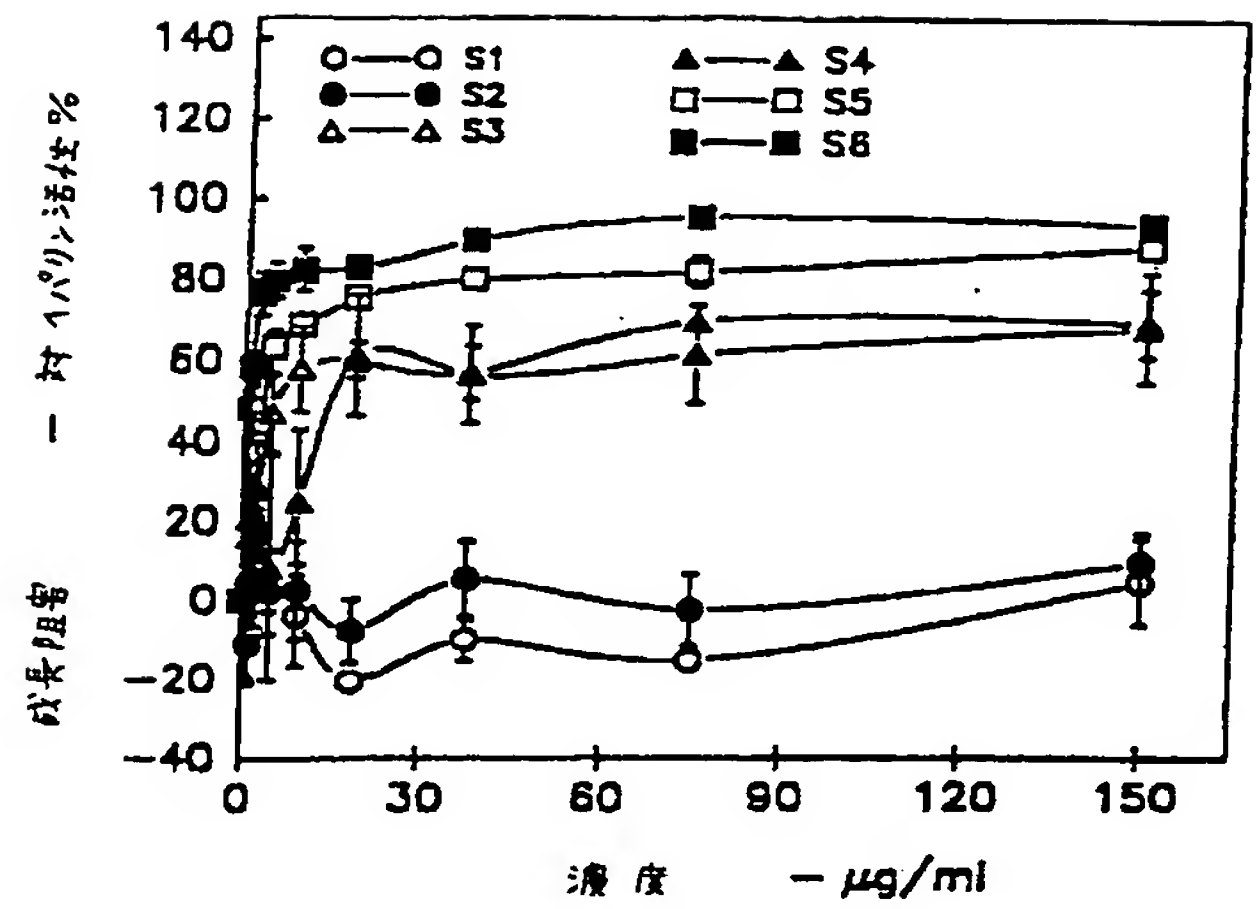


FIG. 4B

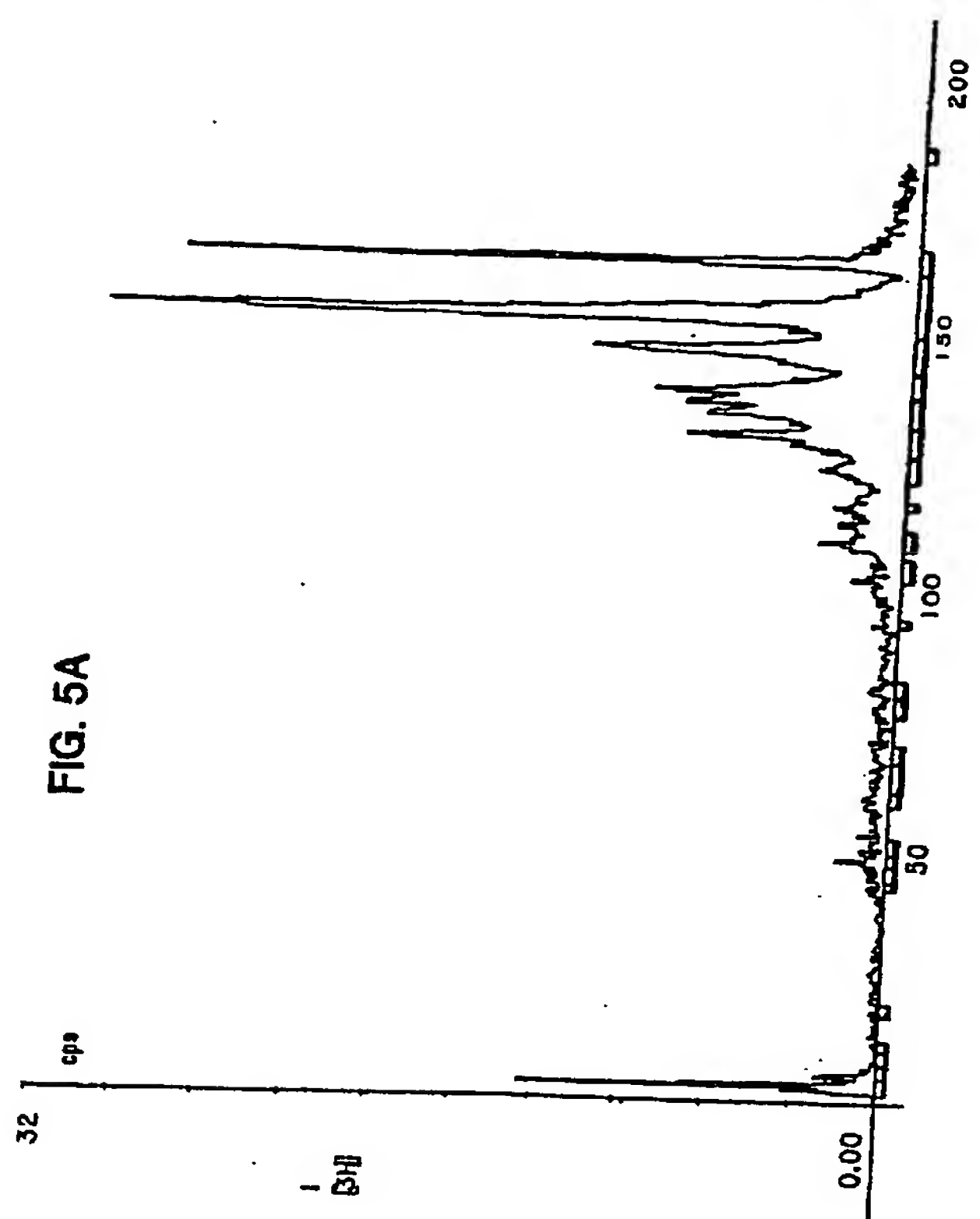


FIG. 5A

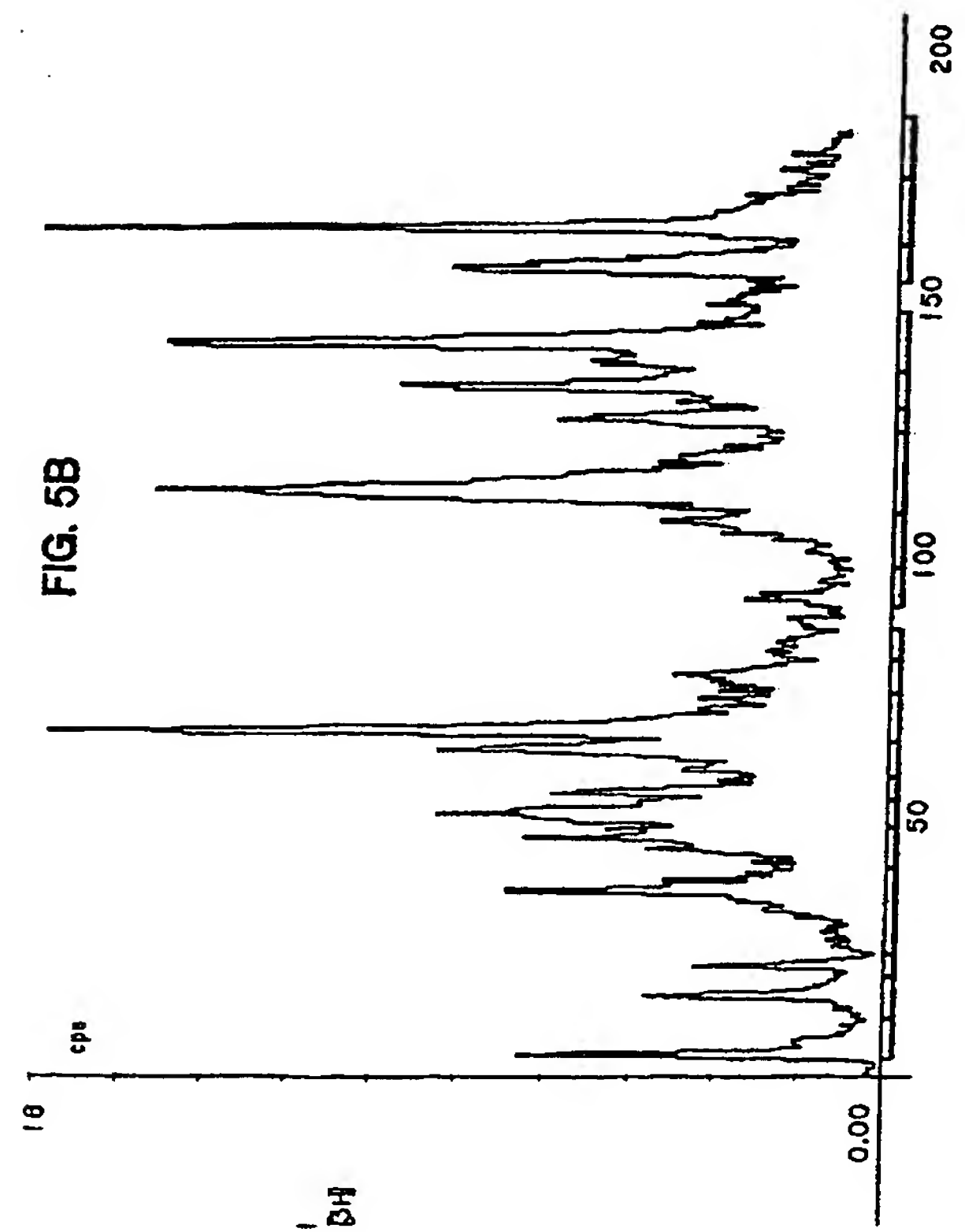


FIG. 5B

n=2

	A	B	A'	B'	C'	D
1	X	X			X	X
2	X	X			X	
3	X	X				
4		X			X	X
5		X			X	
6	X	X				X
7		X			X	X
8	X				X	X
9	X				X	X
10	X					
11		X				X
12	X	X	X		X	X
13	X	X	X		X	X
14	X	X	X			
15		X	X		X	X
16		X	X		X	
17	X	X	X			X
18		X	X		X	X
19	X		X		X	X
20	X		X		X	
21	X		X			X
22		X	X			X
23	X	X		X	X	X
24	X	X		X	X	
25	X	X		X		
26		X		X	X	X
27		X		X	X	
28	X	X		X	X	X
29				X	X	X
30	X			X	X	X
31	X			X	X	
32	X			X		X

FIG. 6A

n-2

	A	B	A'	B'	C'	D
33		X		X		X
34	X	X	X	X	X	X
35	X	X	X	X	X	
36	X	X	X	X		
37		X	X	X	X	X
38		X	X	X	X	
39	X	X	X	X		X
40			X	X	X	X
41	X		X	X	X	X
42	X		X	X	X	
43	X		X	X		X
44		X	X	X		X
45			X	X		
46	X		X	X		
47		X	X	X		
48			X	X	X	X
49			X	X		
50	X		X			
51		X	X			
52			X		X	
53			X			X
54	X			X		
55		X		X		
56				X	X	
57				X		X
58						
59						
60						
61						
62						
63						
64						
65						
66						

FIG. 6B

国際調査報告		International Application No. PCT/US92/03092
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC2B 37/19, C07H 13/04, 17/04; A61K 31/713, 31/723 US CL 536/21, 17.3, 17.5, 17.9, 22; 514/42, 56 According to International Patent Classification (IPC) as to technical classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 536/21, 17.3, 17.5, 17.9, 22; 514/42, 56 Documentation searched other than minimum documentation in the cases that such documents are included in the fields searched		
Elements data base searched during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) APL search results and/or classification = L1 Limited/forbidden or inhibition or inhibit		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Character of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to which No.
Y	The Journal of Cell Biology, Volume 100, issued May 1986, "Structural Determinants of the Capacity of Hsp90 to Inhibit the Proliferation of Vascular Smooth Muscle Cells. II. Evidence for a Proteinaceous Sequence that Contains a 3-6-Hydroxy Group", pages 1979-1984, especially Figure 4 of page 1980.	1-4 and 17
Y	Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry, Volume 43, issued 1985, Sanku Cox, "Structure and Biological Activity of Heparin", pages 71-123, especially pages 66, 68 and 71-90.	5-16
Y	US, A, 4,491,662 (Reveron et al) 20 August 1983.	1-17
Y	The Journal of Biological Chemistry, Volume 263, No. 11, issued 15 April 1988 (U.S.A.), O. Fjell et al, "Molecular Analysis of the Oligosaccharide Region of the Human Acid Glycoprotein of Heparin", pages 3193-3201, especially Figure 6 of page 3200.	3-16
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family issues.		
* "A" documents defining the present state of the art which is known to the applicant at the time of filing the application "U" documents which may have been published or otherwise made available to the public prior to the filing date of the application but which are not known to the applicant at the time of filing the application "W" documents which are not known to the applicant at the time of filing the application but which are known to the public at the time of filing the application "X" documents which are not known to the applicant at the time of filing the application but which are known to the public at the time of filing the application		
Date of the national publication of the international search		Date of filing of the international search report
16 JULY 1992		28 JUL 1992
Name and full address of the ISA/ Competence of Patent and Trademark Box PCT Washington, D.C. 20531		Authorised officer EVERETT WHITE Telephone No. (703) 305-5156
Priority No. NOT APPLICABLE		
Form PCT/ISA/210 (Issued about July 1992)		

フロントページの続き

(72)発明者 ブランドレイ, ブライアン ケイ.
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 94501
 アラミーダ, オーティス ドライブ
 3215

(72)発明者 ラム, ルン エイチ.
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 95014
 カッパーティノ, エヌ. ブルック ス
 クエア 20317
 (72)発明者 レイン, ロジャー エイ.
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 94501
 アラミーダ, マリナ ビュー タワーズ
 806

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☒ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☒ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

THIS PAGE BLANK (USPTO)